



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2012/2013

Micael Mendes Neves **Respostas bioquímicas e populacionais de *Daphnia* a um herbicida**

DECLARAÇÃO

Declaro que a presente dissertação é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos acadêmicos.



**Micael Mendes Neves Respostas bioquímicas e populacionais de *Daphnia*
a um herbicida**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Doutora Ana Marta dos Santos Mendes Gonçalves, Investigadora de Pós-Doutoramento do IMAR-CMA, Departamento das Ciências da Vida, Universidade de Coimbra e da Universidade de Aveiro, e co-orientação do Doutor Bruno Branco Castro, Investigador Auxiliar do Departamento de Biologia e CESAM, Universidade de Aveiro, e do Doutor Fernando José Mendes Gonçalves, Professor Associado com Agregação do Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro.

o júri

presidente

Prof^a Doutora Maria de Lourdes Pereira,
Professora Associada com Agregação Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

arguente

Doutor João Miguel Magalhães Neto, Investigador Auxiliar
IMAR-CMA, Departamento das Ciências da Vida, Universidade de Coimbra

arguente

Doutora Daniela Rebelo de Figueiredo
Investigadora de pós-doutoramento
Departamento de Biologia e CESAM, Universidade de Aveiro

orientador

Doutora Ana Marta dos Santos Mendes Gonçalves
Investigadora de Pós-Doutoramento
IMAR-CMA, Departamento das Ciências da Vida, Universidade de Coimbra
Departamento de Biologia e CESAM / Departamento de Química e CICECO, Universidade de Aveiro

agradecimentos

Gostava de agradecer a todas as pessoas que tornaram a realização deste trabalho possível, em especial:

Ao Professor Doutor Fernando Gonçalves por me permitir fazer parte da equipa que ele dirige e pelo incentivo que sempre me deu.

A Doutora Ana Marta Gonçalves e ao Doutor Bruno Castro pela orientação, paciência e dedicação que me dispensaram de forma a que este trabalho terminasse em bom porto.

A Inês Macário e Ana Gonçalves, as minhas companheiras de mestrado, com as quais vivi momentos que só nós poderemos recordar.

Um grande agradecimento a toda a equipa do LEADER (sim Joana Santos a ti também), a Sofia e ao Bruno Nunes pelos momentos humanos que ajudam a criar laços e a desanuviar o stress.

Aos meus pais e a minha irmã pela dedicação, apoio e afeto ao longo de todos estes anos.

E claro aos meus amigos (Noémia, Corine, Inês, Hugo, Helder, Sara, Carla, Ana, Sandra, Nuno, Pedro, etc..) pelos momentos e excelência da minha vida académica em Aveiro que me mostram que a vida por muitas voltas que dá voltamos sempre a estar a luz do sol.

A todas as pessoas que referi (e outros que não) mais uma vez o meu muito obrigado a todos.

palavras-chave

herbicida, S-metolacoloro, toxicidade, sobrevivência e reprodução, biomarcadores lipídicos, análise de ácidos gordos, organismos não-alvo

resumo

As crescentes exigências alimentares da população humana levaram a um aumento no uso de produtos sintéticos designados como pesticidas. No entanto, estes xenobióticos produzem efeitos que vão além dos ecossistemas e organismos alvo, afetando as populações e comunidades biológicas dos ecossistemas aquáticos nas vizinhanças dos terrenos agrícolas. Uma vez no sistema aquático, estes compostos podem perturbar mecanismos moleculares comuns a vários organismos, podendo levar à diminuição da performance de espécies mais sensíveis, acabando por desequilibrar o ecossistema em causa. Neste trabalho pretendeu-se avaliar o efeito do herbicida Primextra® Gold TZ (herbicida aplicado em culturas de milho) e do seu principal princípio ativo (S-metolacoloro), em populações de cladóceros de água doce, a diferentes níveis de organização biológica. O milho é uma cultura importante em Portugal e na Europa, e são várias as formulações comerciais de herbicidas para esta cultura que incluem o S-metolacoloro como princípio ativo. O estudo foi realizado em *Daphnia longispina* (Crustacea: Cladocera) pela posição chave que ocupa na transferência de massa e energia na teia trófica de ecossistemas lênticos. Em primeiro lugar, pretendeu-se avaliar os efeitos destes xenobióticos no crescimento e reprodução de *D. longispina*, utilizando ensaios agudos e crónicos de acordo com protocolos padronizados. Ambos os compostos apresentaram efeitos negativos nos parâmetros reprodutivos deste crustáceo, sendo a formulação ligeiramente mais tóxica que o princípio ativo. Concluiu-se que estas substâncias são prejudiciais ao ecossistema aquático a partir de 4,0 mg/L de S-metolacoloro. Com base nestes valores, pretendeu-se determinar alterações nos perfis lipídicos desta espécie, quando exposta a concentrações subletais do princípio ativo, e perceber possíveis impactos multigeracionais da referida exposição. Os biomarcadores lipídicos são importantes indicadores da dinâmica das teias tróficas, permitindo identificar a condição fisiológica dos organismos. Mais ainda, é importante compreender os efeitos do herbicida nos ácidos gordos essenciais (e.g. ácidos gordos poli-insaturados: PUFA e HUFA), dado o seu papel na reprodução e crescimento destes herbívoros. A identificação e quantificação dos ácidos gordos em *D. longispina* foram efetuadas com recurso a cromatografia gasosa com detetor FID (flame ionization detector), após extração dos mesmos através da transesterificação (ou metanólise) dos triglicéridos e separação dos metil-ésteres produzidos. Não foram observadas alterações significativas nos parâmetros populacionais (exceto na 1ª ninhada) após exposição ao S-metolacoloro. A análise dos ácidos gordos também não revelou alterações significativas nos perfis lipídicos que possam ser provocadas pelo composto testado. Mais importante ainda, a experiência demonstrou que o S-metolacoloro não produziu efeitos na geração seguinte, o que sugere que as comunidades poderão recuperar depois de expostas a este xenobiótico.

keywords

herbicide, S-metolachlor, toxicity, survival and reproduction, lipidic biomarkers, fatty acid analysis, non-target organisms

abstract

The growing demand of the human population has led to an increase in the use of synthetic products, mainly pesticides. However, these xenobiotics may produce effects going beyond target organisms and ecosystems, affecting the biotic populations and communities in agroecosystems. Once in the aquatic system, these chemicals may disturb molecular mechanisms, common to several organisms, leading to underperformance of the most sensitive species, causing ecosystem unbalance. In this study, we studied the effect of a commercial formulation of an herbicide (Primextra[®] Gold TZ) and its active ingredient (S-metolachlor) on freshwater cladoceran populations, at different levels of biological organization. S-metolachlor is used in many herbicide formulations applied in corn/maize cultures, which is a relevant culture in Portugal and in Europe. The model organism chosen is a common cladoceran species (*Daphnia longispina*; Crustacea: Cladocera), which occupies a key position in the food web of lentic systems. First, the effect of the xenobiotics on the survival and reproduction of *D. longispina* was tested using standard acute and chronic assays. Both chemicals negatively affected the cladoceran's reproductive parameters, with the commercial formulation being slightly more toxic than the active principle. We concluded that these chemicals are prejudicial to the aquatic ecosystems above 4.0 mg/L of S-metolachlor. Based on these values, we determined changes in the fatty acid profiles of the species, when exposed to sublethal concentrations of the active principle. The experimental design also allowed assessing potential multigenerational impacts of the exposure to S-metolachlor. Lipid biomarkers are important indicators of food web dynamics, allowing the identification of the organisms' physiological status. Moreover, we intended to understand the effects of the herbicide on essential fatty acids (namely polyunsaturated fatty acids, PUFA and HUFA), given their role on the growth and reproduction of the model herbivores. The identification and quantification of fatty acids in *D. longispina* was performed with gas chromatography with a flame ionization detector, after extraction through transesterification (or methanolysis) of triglycerides and separation of the resultant methyl-esters. No significant populational changes (except in the 1st clutch) were found after exposure to S-metolachlor. Fatty acids analyzes also did not show significant changes in lipid profiles caused by the tested compound. More important, this experiment showed that S-metolachlor did not cause effects in the subsequent generation, thus suggesting that biotic communities may recover after exposure to the xenobiotic.

Índice Geral

Introdução Geral	1
1. Contaminação aquática e atividades humanas	3
2. Agroecossistemas e agroquímicos	4
3. Efeitos ecotoxicológicos e níveis de organização biológica	7
4. Efeitos de xenobióticos sobre perfis lipídicos	9
5. Caso de estudo: Efeito do Primextra® Gold TZ (herbicida) em <i>Daphnia longispina</i>	15
6. Objetivos da dissertação	19
Referências Bibliográficas	20

Capítulo 1: Acute and chronic responses of *Daphnia longispina* to commercial formulation (Primextra ® Gold TZ) and active ingredient (S-metolachlor) of a herbicide

• Introduction	29
• Material & methods	30
• Results	32
• Discussion	34
• Conclusion	36
• References	37

Capítulo 2: Multigenerational effects of S-metolachlor in experimental microcosms: population responses versus fatty acid profiles of *Daphnia longispina*

• Introduction	43
• Material & methods	44
• Results	48
• Discussion	55
• Conclusion	57
• References	58

Introdução Geral

1. Contaminação aquática e atividades humanas

Desde os tempos primordiais que o planeta Terra é ocupado maioritariamente por massas de água, que foi e é ainda hoje o meio e elemento fundamental à vida (Franks 2000). Por várias razões, é inevitável a interação dos humanos com os sistemas aquáticos. Esta interação resulta das nossas necessidades básicas como seres vivos e das atividades de subsistência (agricultura), recreação (estâncias balneares), produção de bens (indústria) e eliminação de resíduos (sistemas de esgotos) junto das massas de água. Estas atividades podem causar instabilidade nos sistemas aquáticos com graves repercussões para os humanos e para os restante seres vivos, tais como a contaminação ou mesmo a erradicação de espécies com grande importância alimentar, e a diminuição da qualidade da água, podendo torná-la imprópria para consumo humano (Soares & Porto 2007; Rattner 2010).

Além disso, a maioria das atividades humanas gera resíduos que vão desde gases a resíduos radioativos. Embora cada questão possa ser subdividida em uma miríade de processos individuais ou atividades, os principais problemas de qualidade de água provocados por atividades humanas incluem a deposição de matéria orgânica, oligoelementos (metais pesados), deposição atmosférica ácida e drenagem, salinização, aumento de nutrientes inorgânicos (principalmente azoto e fósforo), sedimentos em suspensão, óleos, compostos orgânicos sintéticos, poluição térmica e proliferação de agentes patogénicos (incluindo bactérias, vírus e protozoários intestinais), aparecimento de espécies exóticas e invasoras, uso de compostos orgânicos sintéticos, e radioatividade (Peters 2006). Além das várias questões particulares, cada atividade humana tem um potencial efeito cíclico sobre a qualidade e quantidade de água ao longo dos canais aquáticos. A degradação da qualidade da água por uma substância tem efeitos negativos, que são determinados pelo seu tempo de permanência nos recursos hídricos. A natureza da substância e a sua capacidade para se transformar, afeta a sua mobilidade, a escala de tempo para sua remoção e os seus efeitos sobre a qualidade da água (Peters 2006).

Dentro das atividades dependentes dos meios aquáticos, temos aquelas que, de forma direta, afetam os ecossistemas aquáticos, como por exemplo a pesca. Das atividades que de forma indireta afetam as massas de água, temos o exemplo da agricultura. O maior perigo advém destas últimas, que resultam do uso de substâncias químicas que podem contaminar o ambiente acidentalmente e/ou intencionalmente; estas substâncias podem ser utilizadas para controlo de infestações, resultantes da atividades industrial e de lazer, produtos utilizados na limpeza e sistemas de esgotos (Harrison 1996). Na maioria das vezes, estas atividades acabam por ter um efeito mais severo e irremediável do que as que têm ação direta. Este facto deve-se muitas vezes aos efeitos inesperados e imprevisíveis que podem ter (Merrington *et al.* 2002). Os efeitos a nível de metabolismo dos organismos enquadram-se nesta categoria, pois podem ter repercussões posteriores na escala temporal ou na hierarquia da teia tróficas. Alguns destes efeitos podem passar pela inibição de proteínas ao mimetismo de hormonas (Fry 1995; Karam *et al.* 2003).

A contaminação das massas de água resulta do excesso de determinadas substâncias químicas, devido à falta ou inadequação de meios de tratamento ou pelo desrespeito das regras de eliminação de certos resíduos químicos tais como o mercúrio, chumbo, PBDEs, PCBs, PCTs (Harrison 1996), e aplicação, muitas vezes desproporcional, de agroquímicos e, mais recentemente, apareceram registos de contaminações por PFCs (Grandjean *et al.* 2012). Todos estes compostos são exemplos de uma crescente lista de contaminantes encontrados nos cursos de água (Grandjean *et al.* 2012).

Um dos grandes problemas destas substâncias químicas é a sua persistência no meio natural e a sua capacidade de se bioacumular nos organismos vivos, o que pode levar à biomagnificação, quando a dose de contaminante aumenta à medida que se progride na teia trófica, por transferência cumulativa de um elo para o seguinte (Soares & Porto 2007). Isto pode provocar uma quebra no desempenho de uma espécie (taxa de natalidade baixa, alta mortalidade juvenil, disrupções endócrinas e falhas sistémicas). Um exemplo bastante conhecido é o do composto DDT, nas décadas de 50 e 60, que causa uma deficiência na calcificação da casca dos ovos de várias espécies de aves (sobretudo rapinas), o que teve impactos substanciais no recrutamento da população. Esta deficiência inviabilizava o desenvolvimento de novas proles devido à ação dos metabolitos do DDT, entre os quais se destaca o DDE (diclorodifenildicloroetano) pelo fato deste ser altamente estável no meio ambiente (Grier 1982). Este metabolito é o que apresenta maior impacto para os ecossistemas, visto a sua propensão em bioacumular, levando a desregulações endócrinas que podem afetar o desenvolvimento dos embriões (Colborn *et al.* 1993). A biomagnificação do DDE nas teias tróficas levou a que atingisse concentrações preocupantes em várias rapinas (predadores de topo), o que causou alterações no metabolismo do cálcio nos adultos, com consequências na rigidez da casca dos ovos, como já explicado anteriormente. Este é um caso paradigmático, pois demonstra como uma pequena alteração ao nível bioquímico ou subcelular se transformou no declínio populacional de um predador de topo, alterando a dinâmica do ecossistema.

Deste modo, os compostos químicos são dos principais contaminantes dos cursos de água a nível mundial (Daughton 2004). Assim, é fundamental a avaliação e monitorização do impacto destas substâncias.

2. Agroecossistemas e agroquímicos

Um agroecossistema é um ecossistema no qual se integra pelo menos uma população agrícola rodeada por habitats naturais ou seminaturais e com presença de infraestruturas humana (Moonen 2008). Desde os primórdios da civilização humana, tem-se lidado com pragas que têm ameaçado as culturas agrícolas, os animais e os humanos. Este aspeto levou ao desenvolvimento de substâncias para controlo de pragas. Os primeiros registos

remontam à Súmeria no ano de 2500 AC e persistem até ao início do século XX, com a utilização de produtos naturais (mercúrio, arsénio, sal, mel). Apenas no período pós-guerra com a utilização de produtos químicos compostos, houve uma maior eficácia no controlo de pragas, e a eficácia destes produtos aumentou as reservas alimentares da nossa espécie (revolução “Verde”) (Hedden 2003). Contudo, a utilização massiva de produtos químicos para melhoramento da produtividade agrícola também trouxe um efeito adverso, matando não apenas as pragas que se pretendiam, mas também outros organismos, acabando por contaminar ecossistemas e pondo em risco certas espécies “benéficas” (Vilarinho 2011).

Os agroquímicos, no âmbito dos agroecossistemas, são compostos naturais ou artificiais utilizados na remediação de situações de praga e doenças e melhoramentos do rendimento da cultura (tais como aditivos e melhorantes foliares). Dentre os agroquímicos destaca-se a relevância dos pesticidas nos agroecossistemas. Os pesticidas têm como principal função o controlo de pragas e dividem-se nas seguintes subclasses: herbicidas, acaricidas, fungicidas, biocidas, inseticidas (ANIPLA/ECPA 2007). A aplicação de pesticidas representa riscos ambientais significativos para a componente natural do agroecossistema, sendo uma fonte de poluição importante, podendo originar efeitos ecotoxicológicos devido à aplicação contínua destes produtos (Fent 2003).

Sendo estes produtos uma solução mas também um problema, surgiram várias diretivas que visam a regulação do uso destas substâncias e assim minimizar o seu impacto nos ecossistemas. A nível europeu, destacam-se as diretivas 2009/127/CE e 2009/128/CE do Parlamento e Conselho Europeus de 21 de Outubro de 2009, sendo que a primeira visa a regulamentação da maquinaria a usar na dispersão de pesticidas e a segunda visa a estabelecer um quadro de ação a nível comunitário sobre utilização sustentável de pesticidas. Adicionalmente, a EU preocupou-se em estabelecer um apertado controlo para o registo, avaliação e autorização de produtos químicos, agregando várias diretivas e regulamentos num único regulamento (REACH, regulamento 1907/2006).

No entanto, o uso de pesticidas é ainda elevado no espaço da União Europeia (Tabela 1). De acordo com a tabela 1, tem-se registado um aumento de vendas de pesticidas em alguns países, nomeadamente em Portugal (ligeiro). Não obstante os números serem estáveis nos anos mais recentes, existem países nos quais o aumento de vendas foi relativamente grande (e.g. Hungria ou Letónia) no período de tempo referenciado na tabela (eurostat.ec.europa.eu acedido em 10/4/2013). Assinale-se também a redução evidente nas vendas em França, importante país produtor e exportador de produtos agrícolas.

Tabela 1 – Vendas de pesticidas (em toneladas) em 25 Estados-Membros da União Europeia (eurostat.ec.europa.eu, acedido em 10/04/2013), com destaque para Portugal.

GEO	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
European Union (1...	352,904	332,807	327,642	:	:	:	:	:	:	:
Belgium	9,521	9,953	8,845	9,204	8,822	9,186	9,776	:	:	:
Denmark	2,929	2,889	3,127	2,912	2,991	2,941	3,299	3,254	3,354	4,051
Germany (until 19...	30,231	30,331	27,885	29,531	30,164	28,753	29,512	31,819	32,683	34,664
Estonia	184	306	329	329	322	357	393	467	459	:
Ireland	2,102	2,133	2,486	2,796	2,913	3,104	2,776	2,874	:	:
Greece	10,153	11,131	11,111	:	:	:	:	:	:	:
Spain	33,614	34,597	35,700	:	:	:	:	:	:	:
France	120,501	94,694	99,635	82,448	74,524	76,099	78,265	71,612	77,255	:
Italy	82,048	79,831	76,346	94,711	86,705	84,292	85,073	81,450	:	:
Latvia	:	284	369	339	418	597	733	2,239	1,052	:
Luxembourg	421	:	:	:	:	:	:	:	:	:
Hungary	5,795	5,473	6,431	8,232	8,726	9,941	9,676	11,523	11,178	12,084
Malta	:	184	217	222	243	:	:	:	:	:
Netherlands	10,196	9,655	7,987	8,073	7,868	9,071	9,309	9,410	10,740	:
Austria	3,419	3,563	3,133	3,080	3,386	3,302	3,404	:	:	:
Poland	8,469	8,848	8,855	10,358	7,184	8,726	16,039	17,102	15,303	:
Portugal	15,396	15,469	15,491	17,435	17,046	16,938	16,346	15,703	16,689	17,060
Slovenia	:	1,469	1,399	1,164	1,361	1,560	1,384	1,281	:	:
Finland	1,141	1,146	1,424	1,620	1,667	1,489	1,431	1,645	:	:
Sweden	1,698	1,652	1,738	1,711	2,049	942	1,527	1,707	:	:
United Kingdom	25,299	23,601	23,526	23,526	22,564	23,463	23,601	21,151	:	:
Norway	796	378	518	818	658	824	511	690	720	:

É importante ter em mente a produtividade agrícola de cada país. Como exemplo, note-se que a Alemanha apresenta vendas muito superiores de pesticidas do que Portugal, mas possui uma maior área de produção e apresenta níveis superiores de produção agrícola (Tabela 2). . Deste modo, pode questionar-se a eficiência da utilização de pesticidas a nível nacional, sendo necessário uma maior sensibilização junto dos produtores agrícolas com a finalidade de alertar para um potencial uso abusivo.

Tabela 2 – produção de cereais (em 1000 toneladas) dos Estados-Membros da União Europeia e outros países europeus (eurostar.ec.europa.eu, acedido em 10/04/2013), com destaque para Portugal e Alemanha

geo	time	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
European Union (changing composition)		211645.2	187164.2	289911.1	259352.1	245191.2	258902.1	314227.2
EU (27 countries)		:	:	:	:	:	:	:
Belgium		2639.3	2613.6	2951	2817.5	2741.8	2786.8	3307.2
Bulgaria		6736.1	3790.4	7434.7	5818.9	5511.8	3171.3	6976.9
Czech Republic		6770.8	5762.4	8783.4	7659.8	6386.1	7152.9	8443.3
Denmark		8803.7	9050.9	8963.2	9283.1	8632.3	8220.2	9073.5
Germany		43391.3	39426	51097	45980.2	43474.8	40632.1	50104.9
Estonia		524.7	505.7	608.1	760.1	619.3	879.5	864.2
Ireland		1965.6	2149.9	2523	1944.7	2089.8	2006	2461.3
Greece		4074.9	4110	4330.2	4230.4	3623.1	3762	4819.6
Spain		20863.8	20308.3	23965.5	13486.3	18367.5	23820.3	23544
France		69555.7	54875.3	70381.5	63977.8	61613.2	59382.2	70142
Croatia		3080.2	2013.8	3067.5	3038.8	3034.6	2534.2	3725.5
Italy		19877.3	16461.8	21770.8	20092.1	18787.4	18810.5	20459
Cyprus		141.8	164.7	111.4	70.2	66.8	63.5	63.4
Latvia		1028.5	932.4	1059.5	1314.3	1158.7	1535.2	1689.4
Lithuania		2539.1	2631.8	2859.4	2811.1	1857.8	3017	3421.9
Luxembourg		168.8	164.1	179	160.6	161.5	148.4	189.7
Hungary		11695.9	8758.4	16769.7	16203	14459.6	9643	16830.7
Malta		0 (a)	0 (a)	0 (a)	0 (a)	0 (a)	0 (a)	0 (a)
Netherlands		1823.9	1917.1	1923.3	1857.3	1749.9	1622.6	2062.6
Austria		4757.3	4263.8	5315.3	4898.3	4460	4757.9	5747.8
Poland		26877.3	23390.8	29635.1	26927.8	21775.9	27142.8	27664.3
Portugal		1356.9	1043.7	1219.2	675.4	1048.9	909.8	1160.9
Romania		14355.9	12964.2	24398	19331.2	15740.9	7788.6	16777.5

Apesar da legislação restritiva, a aplicação de pesticidas continua a ser alvo de muitas críticas, devido à sua baixa eficácia e ao aparecimento de fenómenos de resistência (Vasquez 1995), o que leva ao aumento das doses aplicadas no campo. Este facto tem consequências, quer a nível ambiental quer a nível humano, aumentando os casos de exposição aguda e crónica. Consequentemente, ocorre a diminuição ou erradicação de espécies benéficas e o aparecimento de deformações morfológicas, cancros, danos neurológicos e problemas cardiorrespiratórios (Pimentel 2005).

3. Efeitos ecotoxicológicos e níveis de organização biológica

Em locais altamente contaminados ocorrem efeitos agudos, comprometendo seriamente o funcionamento do ecossistema e tornando-os alvo de programas de mitigação e remediação. Contudo, o caso mais comum reside nos efeitos crónicos, que causam cenários de exposição prolongada e continuada (Pimentel 2005). Os efeitos ecotoxicológicos ocorrem em todos os níveis de organização biológica, desde o nível molecular até à sua ação a nível do ecossistema. Assim, todo o ecossistema é afetado e não apenas organismos específicos, acabando por afetar a estrutura e funcionalidade do ecossistema – ver o exemplo do DDT/DDE. Contaminantes presentes em grandes áreas, geralmente, têm propriedades críticas como a toxicidade, persistência ambiental alta, elevada mobilidade. Este conjunto de características propicia a contaminação das águas subterrâneas e superficiais. Muitos destes contaminantes possuem alta lipofilicidade resultando em biomagnificação em teias alimentares (Fent 2003).

Torna-se necessário perceber o efeito que os diferentes contaminantes têm a todos os níveis biológicos, principalmente a nível molecular, pois neste nível os efeitos ocorrem de forma mais rápida do que nos restantes sistemas e podem ter um efeito extremamente importante que a longo prazo pode culminar em alterações a níveis superiores (Clements 2000). O caso acima referido do DDT é um ótimo exemplo desta série de acontecimentos. A metabolização deste levou à inibição de enzimas (ATPases) dependentes do cálcio, que teve como resposta fisiológica por parte dos indivíduos contaminados a produção de ovos de casca mais fina, o que levou a uma diminuição da natalidade e consequente diminuição da população de aves de rapina (Newman 1998). As populações de presas aumentaram em consequência da diminuição das aves de rapina, aumentando assim a pressão sobre os produtores e causando a consequente destabilização do ecossistema (Carson 1962).

De modo a avaliar as alterações induzidas por contaminantes à escala molecular ou subcelular, é comum utilizar marcadores bioquímicos ou biomarcadores. A utilização de biomarcadores em ensaios laboratoriais, ou em estudos de campo, pode ajudar a perceber o impacto de uma substância potencialmente tóxica para o organismo. Um biomarcador é um parâmetro que permite avaliar um possível impacto negativo de um stress químico, físico ou biológico num organismo (van der Oost 2003). A utilização de biomarcadores moleculares pode indicar alterações graves antes que estas se tornem irremediáveis,

causando efeitos a níveis de organização superior (ver Figura 1), podendo levar a alterações ao nível das comunidades, perturbando o ecossistema.

Existem 3 classes de biomarcadores: 1) Biomarcadores de exposição: Pode ser um composto exógeno (ou metabolito) dentro do corpo que reflete a exposição a um xenobiótico (Hernández 2007). Ex: fluidos corporais refletem a contaminação de um órgão, 2) Biomarcadores de efeito: Indicam alterações bioquímicas como resposta a exposição de um xenobiótico (Hernández 2007). Ex: Aumento de produção de proteínas, 3) Biomarcadores de suscetibilidade: Indicam a capacidade adquirida ou inerente dum organismo em resposta à exposição de um tipo específico de xenobiótico, incluindo fatores genéticos e alterações em recetores que possam modificar a suscetibilidade do organismo mediante a exposição (van der Oost 2003). Ex: Sobre-expressão do citocromo P450.

No entanto, como é referenciado por Castro (2001), esta divisão por classes não é consensual entre autores, sendo que alguns refutam estas definições devido aos seus limites mal estabelecidos que podem induzir confusão. Castro (2001) afirma que alguns biomarcadores podem reagir em determinada situação como biomarcadores de efeito e noutra situação como biomarcador de suscetibilidade.

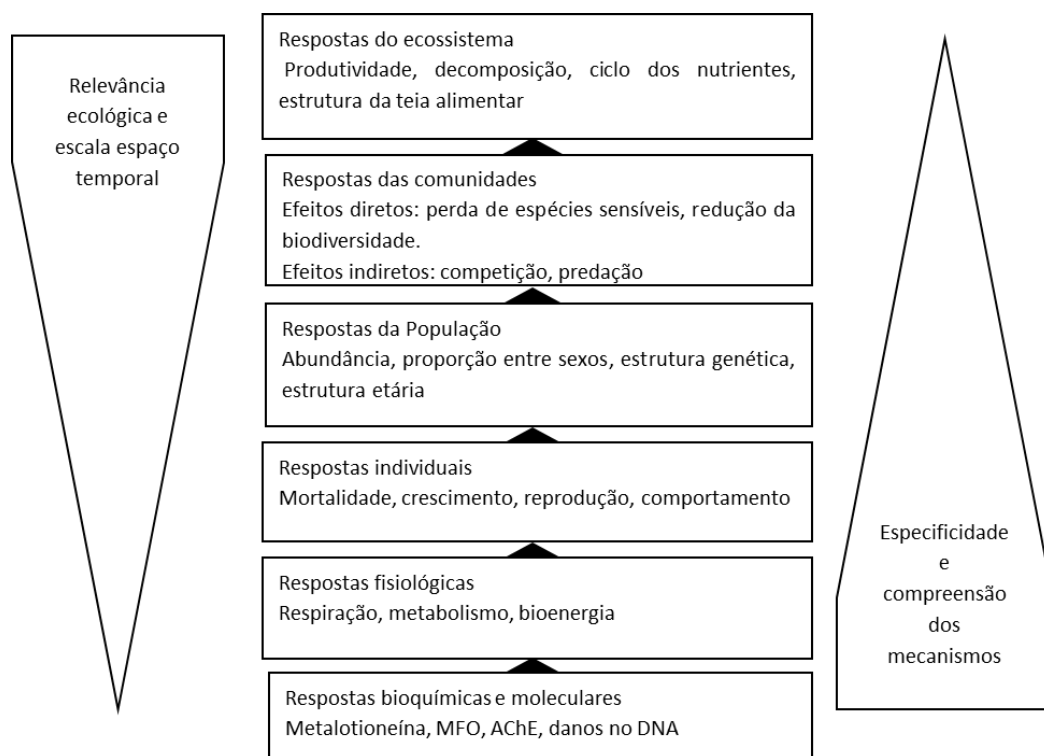


Figura 1- Efeito das interações entre os diferentes níveis biológicos (Adaptado de Clement 2000) - este esquema demonstra as relações entre os vários níveis que compõem os sistemas vivos.

O primeiro caso a apresentar uma abordagem ao nível molecular e celular, é um caso de estudo em linha celular MCF-7, linha celular esta que deriva de células do carcinoma da mama humana. Neste estudo foram usados pesticidas do grupo dos organofosfatos, cuja

toxicidade se pensava ter como alvo a acetilcolinesterase (AChE). No entanto, este estudo demonstrou que o efeito ia muito para além dos efeitos na acetilcolinesterase, levando ao aparecimento de micronúcleos resultantes de danos a nível cromossomal, aumento da proliferação de linfócitos B, sobre expressão do gene responsável pela produção da isoenzima citocromo P450, sendo ainda registadas alterações bioquímicas conformacionais a nível de lípidos e proteínas (Ukpebor 2010). Este primeiro caso demonstra que o impacto destas substâncias a nível molecular e celular é muito mais vasto e devastador do que se pensa, mesmo em caso de substâncias com um determinado mecanismo de toxicidade supostamente específico (inibição da AChE).

Um segundo caso de estudo (relativo ao DDT, já aqui falado) demonstra como os xenobióticos podem assumir o papel de hormonas chave e também a sua capacidade de inibir determinados mecanismos enzimáticos dos organismos por eles contaminados. O DDT influenciava de forma nefasta as aves de rapina. Este facto deve-se pelo facto deste pesticida imitar a ação do estrogénio. Nas aves, o embrião é por defeito masculino (macho homogamético-ZZ e fêmea heterogamética-ZX), sendo que o desenvolvimento dos embriões destas é dependente de estrogénio. Este facto levava ao aparecimento de alterações nas gónadas e na glândula uropigial (Fry 1995). Crias que nasciam sob efeito do DDT apresentavam machos efeminados e fêmeas com ovidutos degenerados. A par deste efeito, o DDE – metabolito resultante da metabolização do DDT – inibe a cálcio ATPase, enzima essencial no processo de calcificação da casca dos ovos que ocorre na glândula uropigial, o que leva ao aparecimento de ovos com cascas defeituosas, finas e moles, comprometendo o desenvolvimento dos embriões (Fry 1995).

Estes dois casos demonstram de forma muito clara a importância de se ter conhecimento dos efeitos adversos a nível molecular para o qual a utilização de biomarcadores moleculares pode ajudar na identificação das alterações moleculares induzidas por xenobióticos (van der Oost 2003). Apenas através da compreensão da totalidade do efeito dos xenobióticos poderemos desenhar medidas de minimização ou contenção destes. Convém também lembrar, que são estas substâncias que, em baixas quantidades no ambiente, têm uma maior hipótese de provocar alterações a nível molecular pelo facto de serem as mais estáveis no ambiente.

4. Efeitos de xenobióticos sobre perfis lipídicos

Os xenobióticos são compostos que são considerados estranhos por parte dos organismos, pelo que este não terá mecanismos de proteção contra estes (Coustau *et al.* 2000). Compostos desta natureza que sejam completamente sintéticos apresentam efeitos tóxicos mais graves, uma vez que são substâncias completamente estranhas a um leque muito maior de organismos. Estes compostos conheceram o seu auge após a Segunda Guerra Mundial, altura na qual as fábricas de químicos viraram a utilização dos seus produtos para a agricultura (Murphy 2001).

Sendo que muitos destes xenobióticos aparentam ser lipossolúveis, a utilização de biomarcadores moleculares lipídicos é adequada para o entendimento das alterações que a acumulação destes pode provocar nos perfis lipídicos dos organismos contaminados (Testai *in* Chyczewski 2001). Além disso, a importância dos lípidos no metabolismo celular, dada a sua função estrutural e de armazenamento de energia (entre outras), justifica que se olhe para os potenciais efeitos dos contaminantes, particularmente os xenobióticos, nos perfis lipídicos.

Os lípidos, representados na figura 2, são compostos orgânicos presentes em todos os seres vivos, tendo como característica principal a sua capacidade de se dissolver em solventes orgânicos não polares. Esta particularidade da sua solubilização deve-se à sua elevada composição em hidrocarbonetos, sendo este componente responsável pela sua oleosidade. Os lípidos apresentam uma variada forma de estruturas e funções nos seres vivos, que vão desde hormonas, vasodilatadores, vitaminas, e gorduras, estando na composição de estruturas complexas tais como membranas celulares e lipoproteínas (Pereira 2008).

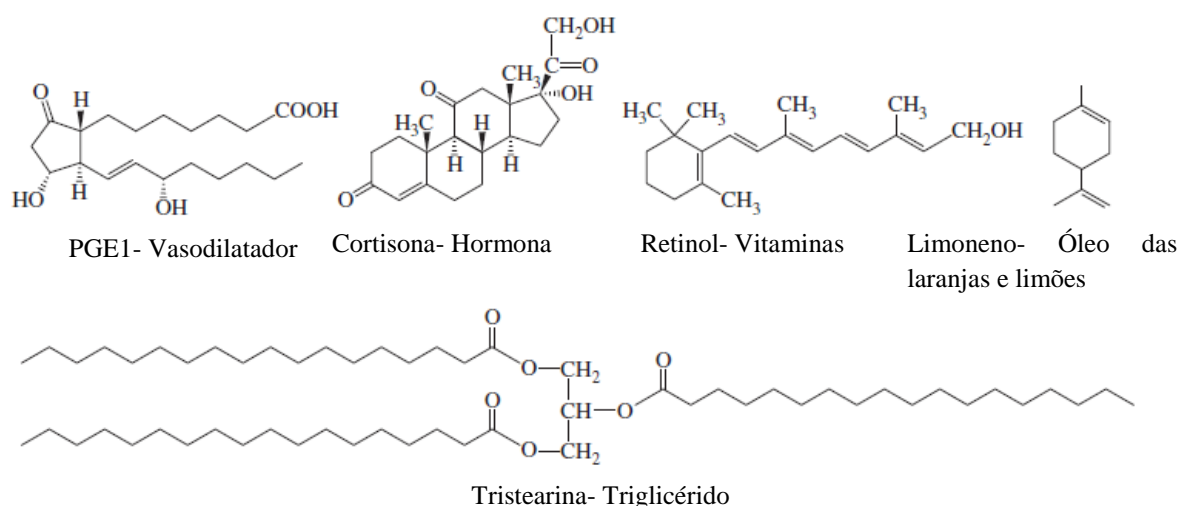
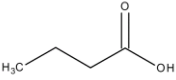
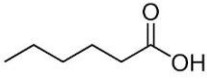
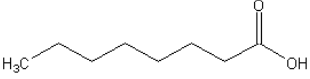
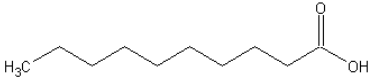
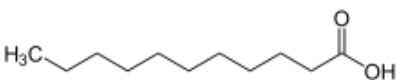
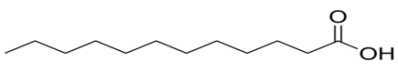
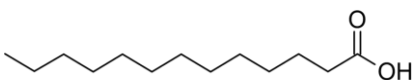
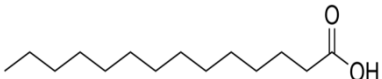
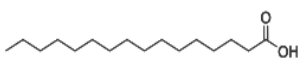
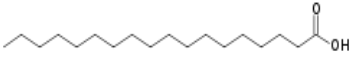
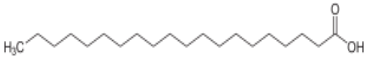
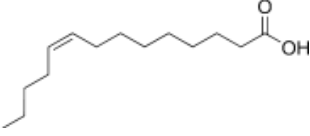
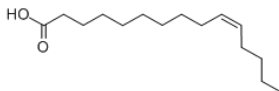
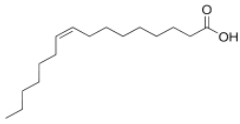
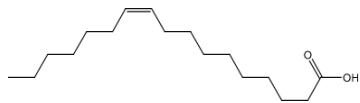
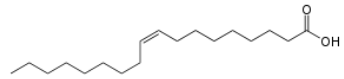
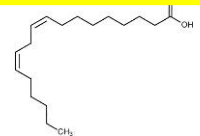
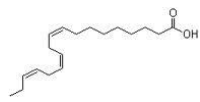
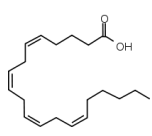
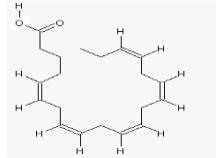


Figura 2 – Estruturas e funções de alguns lípidos (adaptado de Bruice 2004)

De entre os lípidos destacam-se os ácidos gordos, que são de extrema importância pela sua versatilidade, podendo fazer parte de vitaminas, hormonas, gorduras e vasodilatadores. Os ácidos gordos são moléculas compostas por um ácido carboxílico ligado a uma cadeia de hidrocarbonetos que varia em tamanho e grau de saturação. Os ácidos gordos estão normalmente complexados com o glicerol dando origem aos triglicéridos, sendo adquiridos nessa forma via alimentação pela maior parte dos animais, sendo produzidos por plantas, bactérias e algas (Dalsgaard *et al.* 2003). A tabela 3 refere alguns ácidos gordos e algumas das suas características (Bruice 2004).

Tabela 3 - Exemplos de ácidos gordos saturados e insaturados (adaptado de Bruice 2004) - nesta tabela pode perceber-se as diferenças físicas entre ácidos gordos saturados e insaturados. Estão destacados alguns ácidos gordos pela sua importância biológica em particular (ver texto).

Nº de carbonos	Nome Comum	Nome IUPAC	Nomenclatura química	Estrutura	Temperatura de fusão (°C)
Saturados					
4	Ácido butírico	Ácido butanoico	C4:0		-7,9
6	Ácido capróico	Ácido hexanoico	C6:0		-3
8	Ácido caprílico	Ácido octanoico	C8:0		16
10	Ácido capríco	Ácido decanoico	C10:0		31,6
11	Ácido hendecanoico	Ácido undecanoico	C11:0		
12	Ácido láurico	Ácido dodecanoico	C12:0		44
13		Ácido tridecanoico	C13:0		45
14	Ácido mirístico	Ácido tetradecanoico	C14:0		58
16	Ácido palmítico	Ácido hexadecanoico	C16:0		63
18	Ácido esteárico	Ác. octodecanoico	C18:0		69
20	Ácido araquídico	Ácido eicosanoico	C20:0		77
Insaturados					
14	Ácido meristoleico	Ácido 9-tetradecanoico	C14:1		
15		Ácido 10-pentadecanoico	C15:1		

16	Ácido palmitoléico	Ácido (Z)-9-hexadecenoico	C16:1		0
17		Ácido 10-heptadecanoico	C17:1		
18	Ácido oléico	Ácido (Z)-9-octadecenoico	C18:1n9c		13
18	Ácido linoleico	Ácido 9-12-octadecadienoico	C18:2n6t		-5
18	Ácido alfa-linolénico	Ácido cis,cis,cis-9,12,15-octadecatrienoico	C18:3n3		-11
20	Ácido araquidónico	Ácido cis-5-cis-8-cis-11-cis-14-eicosatetraenoico	C20:4n6		-50
20	Ácido eicosapentaenoico	Ácido icosapentaenoico	C20:5n3		-50

Como a tabela 2 demonstra, existem ácidos gordos saturados (SFA – Saturated Fatty Acids) e insaturados (MUFA, PUFA e HUFA – ver abaixo). A diferença que permite distinguir os ácidos gordos (AG) saturados dos ácidos gordos insaturados são as ligações entre átomos de carbono; nos AG saturados, tal como o ácido araquídico, as ligações são simples enquanto nos AG insaturados existe pelo menos uma ligação dupla entre os átomos de carbono (na configuração *cis*) que constituem a cadeia (Pereira 2008). Devido a esta característica, os ácidos gordos insaturados possuem pontos de fusão baixos, o que faz com que se encontrem no estado líquido à temperatura ambiente, enquanto os saturados se encontram em fase sólida (Bruice 2004).

Os ácidos gordos monoinsaturados (MUFA - Mono Unsaturated Fatty Acids) possuem apenas uma ligação dupla na cadeia carbonada. Deste grupo destacam-se o ácido palmitoleico e o ácido oleico. Os ácidos gordos polinsaturados (PUFA - Poly Unsaturated

Fatty Acids, onde se inserem os HUFA – Highly Unsaturated Fatty Acids) são ácidos gordos insaturados que possuem mais do que uma ligação dupla na cadeia carbonada. Neste grupo, destacam-se os ómega-3 ($\omega 3$ ou $n3$) dos quais fazem parte o ácido alfa-linoleico, EPA e DHA (destacados em vermelho na tabela) e os ómega-6 ($\omega 6$ ou $n6$) dos quais fazem parte o ácido linoleico e o ácido araquidónico (destacados a amarelo na tabela). Os PUFA têm como particularidade o facto de serem basicamente produzidos de forma rentável e significativa por algas, plantas e bactérias sendo que os outros organismos os obtêm através de alimentação (Dalsgaard *et al.* 2003).

Estudos recentes (El-Sabaawi *et al.* 2009; Allan *et al.* 2010) têm usado isótopos e biomarcadores lipídicos para identificar as relações na teia alimentar, o que proporciona informação integrada sobre a dieta assimilada pelo organismo. O uso de AG permite uma análise mais específica da fonte alimentar do que a análise por isótopos, uma vez que os AG são transferidos ao longo da teia alimentar sem alterações desde dos produtores até aos mais altos níveis tróficos, tornando-os excelentes biomarcadores. Além da sua utilidade na análise trófica, as alterações nos perfis de ácidos gordos podem também preceder a diminuição da fecundidade e alterações do sistema imunitário, tornando o organismo mais suscetível a doenças, e a mudanças do meio e a alterações da estrutura fosfolipídica das células (Lands 2009). Deste modo, podem ser também usados como marcadores de contaminação ambiental.

Os ácidos gordos são armazenados no organismo sobre a forma de triglicéridos, que podem ser armazenados na própria célula, mas que se encontram maioritariamente nos tecidos adiposos, ficando depositados até as necessidades energéticas do organismo exigirem o seu gasto (Bruce 2004). Em organismos ovíparos, o desenvolvimento dos embriões está totalmente dependente dos nutrientes presentes na gema do ovo (Heming & Buddington 1988), pelo que dietas pobres em ácidos gordos essenciais induzem uma baixa produção de ovos. Os lípidos (nomeadamente triacilglicerol) presentes na gema do ovo servem para a constituição da membrana e como fonte de energia para o desenvolvimento dos embriões (Mourente *et al.* 1990). Os ácidos gordos do grupo $\omega 3$ que se encontram armazenados no triacilglicerol são de alta importância uma vez que irão definir a fluidez da membrana e permitir a ligação de enzimas da membrana com funções celulares (Bell *et al.* 1986). Existe também uma relação entre a quantidade de ácidos gordos do grupo $\omega 3$ e do grupo $\omega 6$, na qual uma maior quantidade de ácidos gordos do grupo $\omega 6$ é indicativa de má qualidade dos ovos (Watanabe *et al.* 1984).

O ácido araquidónico (grupo $\omega 6$) nos mamíferos funciona como regulador da resposta inflamatória dos organismos estimulando a produção de prostaglandinas, leucotrienos e outros metabolitos relacionados e regulando a atividade das células inflamatórias. AG do grupo $\omega 3$, quando introduzidos nestas vias metabólicas atua como antagonista do ácido araquidónico levando a uma resposta inflamatória inferior, o que leva a concluir que os AG do grupo $\omega 3$ podem ser usados no combate a doenças inflamatórias e em casos de ativação inapropriada do sistema imunitário (Clader & Grimble 2002).

Kris-Etherton *et al.* (2003) demonstraram que uma alimentação rica em AG do grupo ω 3 diminui o risco de doenças cardio-vasculares e cardíacas, no entanto salienta também ser necessário mais estudos para a confirmar e definir os benefícios para a saúde dos AG do grupo ω 3.

Os ácidos gordos podem também ajudar na prevenção ou no tratamento de doenças cardiovasculares, ontogénese, disfunção comportamental (e.g. agressões, homicídios), aterosclerose, alguns cancros e doenças autoimunes, quando ingeridos em quantidades equilibradas na dieta alimentar (Arts *et al.* 2009). Do ponto de vista epigenético, há evidências de que estes podem regular determinados genes ou oncogenes (Benatti *et al.* 2004). Davidson *et al.* (2009) demonstrou que os PUFA (ómega 3) modulam a expressão de miRNAs que parecem impedir a formação de tumores (tumores do colón).

Os ácidos gordos estão envolvidos nos mais diversos processos do organismo. Torna-se evidente que a ação dos xenobióticos possa ter algum efeito nestes mecanismos da ação ou mesmo a sua configuração.

Estudos recentes (Wolf *et al.* 2008; Vulimiri *et al.* 2011) têm mostrado que certos xenobióticos interagem com os recetores PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors), que controlam diversos processos tais como:

- Proliferação e diferenciação de adipócitos;
- Homeostasia da glucose;
- Funções vasculares;
- Desenvolvimento embrionário e fetal;
- Resposta inflamatória;
- Metabolismo e transação intracelular de lípidos.

Os PPARs funcionam como reguladores do metabolismo de lípidos e lipoproteínas. Têm também um papel chave na indução da β -oxidação, processo no qual ocorre a degradação de ácidos gordos para fornecer energia ao organismo (Chinetti *et al.* 2000). A ativação indevida ou fora de tempo destes recetores pode ter consequências graves ao nível da saúde do organismo, nomeadamente no caso de fetos, podendo levar a deformações ou mesmo à sua inviabilidade (Lau *et al.* 2010).

Testes realizados em bivalves demonstraram que os xenobióticos são biotransformados (via citocromo P450, glutathione transferase e flavina monooxygenase) em metabolitos e associados a moléculas endógenas, com a finalidade de facilitar a sua expulsão. Este processo leva à formação de metabolitos reativos. O aparecimento de metabolitos reativos pode induzir a formação de Espécies Reativas de Oxigénio (ROS), que apresentam alta toxicidade e mutagenicidade (reagem com proteínas, ácidos nucleicos e lípidos). Apesar das células estarem protegidas destes agentes através de diversos mecanismos, entre os quais a vitamina E (α -tocopherol) e outros agentes antioxidantes, isto induz o organismo a despende energia para este mecanismo de defesa (López-Barea *et al.* 1997). Entre outros

efeitos, isto pode alterar os lípidos presentes nas gónadas em ambientes contaminados levando a uma menor fonte de energia que poderia ser usada na manutenção, crescimento e reprodução do organismo contaminado (Perrat *et al.* 2013).

Gulati (1997) refere que existem dois fatores limitantes no crescimento e reprodução do zooplâncton: o fósforo e os ácidos gordos. No entanto, chama a atenção para uma grande controvérsia que existe ao nível da literatura, relativamente às interpretações e opiniões divergentes sobre a importância de cada um destes fatores. No entanto, deixa claro que os PUFA afetam de forma significativa as taxas de crescimento destes organismos.

Após uma breve revisão bibliográfica, torna-se claro que para o zooplâncton uma alimentação (fitoplâncton) rica em EPA (20:5 ω 3) influencia positivamente as suas taxas de crescimento (Elert 2004), sendo o ω 3 um indicador complementar da qualidade alimentar (Gladyshev *et al.* 2006). A composição dos ácidos gordos destes organismos reflete os que estão presentes na sua dieta diária (Desvillettes *et al.* 1997; Brett *et al.* 2006). No entanto, os zooplancntones apresentavam um menor teor em ácidos gordos saturados e um valor mais elevado de ácido alfa-linoleico do que de EPA quando as temperaturas do ambiente são mais baixas (Taipale *et al.* 2009). Sendo a qualidade do alimento um fator chave para o crescimento e reprodução do zooplâncton (Kilham *et al.* 1997; Masclaux *et al.* 2009), uma perda na qualidade dos ácidos gordos do fitoplâncton, por ação de xenobióticos com capacidade de inibir a síntese de ácidos gordos de cadeias longas e insaturadas (Rivard 2003), pode levar a uma resposta negativa (menor ou inibição da reprodução) por parte destes elementos chave (zooplâncton) da teia trófica.

5. Caso de estudo: Efeito do Primextra[®] Gold TZ (herbicida) em *Daphnia longispina*

O Primextra[®] Gold TZ é uma formulação comercial de um herbicida amplamente utilizado em Portugal e em outros países da Europa. A sua aplicação pode ser feita antes e após a sementeira (3,5 a 4,5 L/ha), podendo ser mesmo utilizado até ao período de pré-emergência para o controlo das infestantes gramíneas, dicotiledóneas anuais e de juncinha (*Cyperus esculentus*) das culturas de milho (syngenta.com/country/pt/pt/). A sua utilização está referenciada nas culturas de milho dos campos circundantes ao rio Mondego estando, de acordo com dados recolhidos em 2009 mediante entrevista aos agricultores, entre os vinte mais vendidos herbicidas usados em Portugal nesse tipo de culturas (User manual annexes Portugal 2012).

De acordo com dados fornecidos pela empresa (Syngenta Corp.) na sua página na internet existem muitos herbicidas, usados por todo o mundo, da gama Primextra, sendo que em todos o único princípio ativo que se mantém nestas formulações é o S-metolaclo.oro.

O S-metolaclo.oro, cuja utilização é permitida pelo Regulamento de Execução (UE) N° 540/2011 da Comissão Europeia e que permitia a sua utilização até 2015, sofreu uma extensão do prazo de aprovação ao ser retificado pelo Regulamento de Execução (UE) N°

1197/2012 da Comissão Europeia até 2017. Para além da referenciada utilização do produto comercial, verificou-se que um dos seus princípios ativos (S-metolacoloro) é uma parte constituinte de outras formulações comerciais (Williams 2010).

Este herbicida destaca-se pela sua ação inibidora da fotossíntese, contribuindo significativamente para esse efeito os princípios ativos (p.a.) que o constituem (S-metolacoloro e terbutilazina). A composição da formulação comercial é indicada na tabela 4, onde são destacados os seus princípios ativos.

Tabela 4- Composição de Primextra® Gold TZ (Adaptado da ficha técnica)

Nome Químico	No. CAS No. CE Número de registo	Classificação (67/548/CEE)	Classificação (REGULAMENTO (CE) N.º 1272/2008)	Concentração
S-metolacoloro	87392-12-9	Xi, N R43 R50/53	Skin Sens.1; H317 Aquatic Acute1; H400 Aquatic Chronic1; H410	30 % W/W
terbutilazina	5915-41-3 227-637-9	Xn, N R22 R50/53	Acute Tox.4; H302 Aquatic Acute1; H400 Aquatic Chronic1; H410	17,4 % W/W
sal de amónio de alfa-sulfo-omeg a-[tris(1-feniletil) fenoxi]-poli(oxi-1 2-etanodiol)	119432-41-6 137672-70-9	Xi R41 R52/53	Eye Dam.1; H318 Aquatic Chronic3; H412	0 - 5 % W/W
alfa-[2,4,6-tris(1- feniletil)fenil]-om ega-hidroxi-1-po li(oxi-1,2-etanodi il)	99734-09-5 104376-75-2	N R51/53	Aquatic Chronic2; H411	0 - 5 % W/W
1,2-Propandiol	57-55-6 200-338-0	-	-	0 - 5 % W/W

Os princípios ativos S-metolacoloro (principalmente este composto) e a terbutilazina, referidos na tabela 3, apesar da sua especificidade, podem ter impacto nos ecossistemas aquáticos, influenciando a base da cadeia alimentar. O fitoplâncton é de tal forma afetado que a sua taxa de crescimento é gravemente afetada em concentrações mais altas (Pérez *et al.* 2011), e também o zooplâncton é afetado havendo uma significativa redução das taxas de crescimento populacional e elevada mortalidade em concentrações mais elevadas (Liu *et al.* 2005; Silva *et al.* 2011).

O S-metolacoloro (2-Chloro-N- (2-ethyl-6-methylphenyl)-N-[(1S)-2-methoxy-1-methylethyl]acetamide), cuja fórmula química se encontra representada na figura 3 (Sigma- Aldrich), faz parte da família das cloroacetamidas (Kegley *et al.* 2011), caracterizando-se por inibir a síntese de diversos componentes nas plantas tais como lípidos, ácidos gordos, proteínas, flavonóides, afetando a divisão celular e regulação hormonal (Rivard 2003). Pode-se, assim, afirmar que este grupo ou família de químicos funciona como inibidor das zonas meristemáticas das plantas (Karam *et al.* 2003).

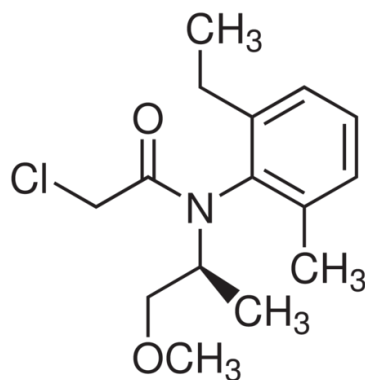


Figura 3- Estrutura da molécula de S- metolacoloro (adaptado do site da Sigma-Aldrich - <http://www.sigmaaldrich.com/portugal.html> - consultado em 20/2/2013)

Como referido anteriormente, o S-metolacoloro (fig. 3) é moderadamente tóxico no meio aquático e relativamente persistente (meia vida de hidrólise acima dos 200 dias a temperatura de 20°C e pH entre 1-9) (Rivard 2003). Apresenta menor toxicidade (NOEC > 800 mg a.s./kg alimento) (Standing Committee on the Food Chain and Animal Health 2004) em aves, no entanto a exposição a longo prazo a este produto pode provocar diminuição da natalidade (extoxnet.orst.edu/pips/metolach.htm acedido a 23/2/2013). Em organismos aquáticos um valor de NOEC: 5.9 mg/L para invertebrados aquáticos (S-metolacoloro, 21 d, *Daphnia magna*) e apresenta um valor de NOEC de 0.78 mg/L (S-metolacoloro, 35 d, *Pimephales promelas*) para peixes (Standing Committee on the Food Chain and Animal Health 2004). Nos insetos, as abelhas parecem ser “ imunes” ao S-metolacoloro, enquanto em minhocas o valor da concentração letal média (CL 50) é de 140 mg/L (extoxnet.orst.edu/pips/metolach.htm acedido a 23/2/2013). O Regulamento de Execução (UE) N° 540/2011 refere que os estados membros devem estar atentos a potencial contaminação subterrânea dos metabolitos deste composto (CGA 51202 e CGA 354743).

Em termos de efeitos toxicológicos, este composto tem efeitos agudos e crónicos, podendo provocar cancro, danos diretos em órgãos (fígado, pele, olhos, etc.), efeitos ao nível reprodutivo e efeitos teratogénicos (European Commission 2004; EPA 2002).

Estudos realizados provam que este grupo de químicos interfere com mecanismos em organismos não alvo, provocando danos a nível da molécula de DNA e alterando o ciclo de produção da acetilcoenzima A, podendo estes efeitos comprometer gravemente a viabilidade dos organismos contaminados (Peterson 2001). Como foi acima referido, este composto ainda é permitido no espaço da união europeia, tendo a sua licença de venda alargada até 2017 (Regulamento de Execução (UE) N° 1197/2012).

A terbutilazina (fig. 4) é um algicida, microbiocida e tem sido usado no controlo de lesmas, algas e bactérias. É praticamente não tóxico para os pássaros. No entanto, é moderadamente tóxico para os peixes de água fria e quente, parecendo ser ligeiramente tóxico para os invertebrados aquáticos de água doce e altamente tóxico para os invertebrados estuarinos / marinhos em exposições agudas (Renault 2011). Segundo a

Environmental Protection Agency (EPA), a terbutilazina é da família da triazina (que inclui muitos herbicidas), logo, é fitotóxica para as plantas aquáticas. Quando é libertada no ambiente, dissipa-se lentamente.

De acordo com a World Health Organization (1998), a terbutilazina também apresenta efeitos reprodutivos e teratogénicos. Este composto passou atualmente o processo de avaliação tendo-lhe sido conferida uma licença que terminará em 2021 (Regulamento de Execução (UE) N° 820/2011).

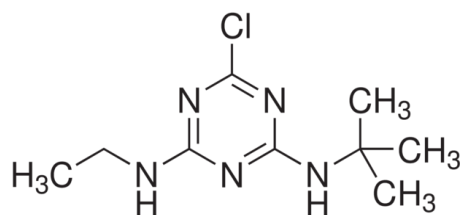


Figura 4- Estrutura da molécula da terbutilazina (adaptado do site da Sigma-Aldrich - <http://www.sigmaaldrich.com/portugal.html> - consultado em 20/2/2013)

O sal de amónio de alfa-sulfo-omega-[tris(1 -feniletil) fenoxi]-poli(oxi-1,2-etanodiil), que é um excipiente que faz parte da composição do herbicida em estudo, figura da lista da EU como sendo um disruptor endócrino (<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/> - acedido em 26/2/2013). Na ficha técnica do herbicida, esta substância é apontada como causadora de lesões óticas e tendo efeitos de toxicidade crónica em organismos aquáticos (syngenta.com/country/pt/pt/produtos/Proteccao_de_culturas/Herbicidas/Pages/PrimextraGoldTZ- acedido em 21/1/2013). Pereira *et al.* (2009) refere que estes supostos produtos inertes podem interagir com os princípios ativos das formulações comerciais potenciando a ação do princípios ativos ou aumentando toxicidade da formulação comercial relativamente à do(s) princípio(s) ativo(s) isolado(s).

A presente dissertação pretende estudar o impacto deste herbicida nos organismos aquáticos. Para tal, é importante selecionar um organismo modelo que tenha importância ecológica no ecossistema em estudo. *Daphnia* é um género de crustáceos da ordem Cladocera, que inclui organismos normalmente chamados de pulga de água ou dáfnia. Estes organismos ocupam uma posição chave na cadeia trófica e nos ecossistemas aquáticos e são altamente sensíveis a alterações do meio (Pereira 2008). Encontram-se também entre os organismos modelo mais estudados em ecologia, ecotoxicologia e biologia evolutiva. É importante referir que estes organismos são um elemento chave no controlo da produção fitoplantónica na maioria dos lagos, devido à sua elevada e eficiente capacidade de filtração, tendo também um papel central na transferência de massa e energia ao longo da teia trófica pelágica (Castro 2007). Perturbações nas populações de dáfrias podem provocar uma produção fitoplantónica descontrolada para além de comprometer a transferência de massa e energia na teia trófica (Gonçalves *et al.* 2008).

A espécie *Daphnia longispina* foi selecionada para o estudo por ser uma espécie autóctone da península ibérica, sendo muitas vezes encontrada em lagos e lagoas nacionais (Petrusek *et al.* 2008; Marques *et al.* 2010). Esta espécie tem a vantagem logística de ser de fácil manutenção em laboratório, por ser altamente fecunda (reproduz-se por partenogénese) e por ter um ciclo de vida relativamente curto, o que permite avaliar os efeitos toxicológicos em diferentes estados etários (Pereira 2008).

6. Objetivos da dissertação

Tendo em mente a problemática aqui apresentada, surgiu o interesse em avaliar a toxicidade do herbicida Primextra Gold e do seu princípio ativo relativamente a organismos não-alvo, presentes nos ecossistemas aquáticos. Dados os seus potenciais efeitos ao nível da biossíntese, pretendeu-se avaliar os efeitos destes compostos em vários níveis de organização biológica, ligando respostas moleculares e populacionais. Por haver vários objetivos específicos neste trabalho, tomou-se a opção de aqui os apresentar em dois capítulos autónomos, escritos em inglês e em formato de artigo científico

O capítulo 1 visa, através do uso de testes ecotoxicológicos, responder ao seguinte objetivo deste trabalho:

- Determinar os efeitos agudos (imobilização) e crónicos (reprodução) da formulação comercial (Primextra® Gold TZ) e do seu princípio ativo (p.a.) S-metolaclo-ro em *D. longispina*.

O capítulo 2 suporta-se nos dados obtidos com os trabalhos executados no capítulo anterior, e pretende responder aos dois objetivos seguintes:

- Determinar e identificar alterações qualitativas e quantitativas nos perfis de ácidos gordos de *D. longispina* após exposição ao S-metolaclo-ro;
- Relacionar possíveis variações no perfil de ácidos gordos com os parâmetros populacionais de *D. longispina* após exposição ao S-metolaclo-ro.

Referências Bibliográficas

- Allan, E. L.; Ambrose, S.T.; Richoux, N.B.; Froneman, P.W.; (2010) Determining spatial changes in the diet of nearshore suspension- feeders along the South African coastline: stable isotope and fatty acid signatures. Estuarine Coastal and Shelf Science 87: 463-471
- ANIPLA (2007). Manual técnico - segurança na utilização de produtos fitofarmacêuticos. Associação Nacional da Indústria para a Proteção das Plantas & European Crop Protection Association . ANILPA- Av. das Túlipas - Ed. Miraflores, 6 - 7º D - 1495-161 Algés
- Appendix 4.3. User manual annexes Portugal (2012) acessível em : http://ec.europa.eu/food/plant/gmo/reports_studies/docs/report_2012_mon_810_app2_04_3_annexes_pt_en.pdf
- Arts, M.T.; Brett, M.T.; Kainz, M.J.; (2009) Lipids in Aquatic Ecosystems. Springer, New York: 377
- Bell, M.V.; Henderson, R.J.; Sargent, J.R.; (1986) The role of polyunsaturated fatty acids in fish. Comparative Biochemistry and Physiology 83(B):711-719
- Benatti, P.; Peluso, G.; Nicolai, R.; Calvani M.; (2004) Polyunsaturated Fatty Acids: Biochemical, Nutritional and Epigenetics Properties. Journal of the American College of Nutrition, 23: 281-302
- Brett, M.T.; Müller-Navarra, D.C.; Ballantyne, A.P.; Ravet, J.L.; Goldman, C.R.; (2006) Daphnia fatty acid composition reflects that of their diet. Limnology and Oceanography 51(5): 2428-2437
- Bruice, P.Y.; (2004) Lipids. Organic Chemistry- fourth editions Prentice Hall: 1075-1103
- Carson, R.; Silent Spring (1962) Fawcett Publications, INC., Greenwich, Conneticut.
- Castro, B.B.; (2001) Sensibilidade e relevância ecológica de ensaios ecotoxicológicos para avaliação de risco em locais contaminados. Tese de Mestrado, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal: 8-9
- Castro, B.B.; (2007) Ecologia e selecção de habitat em crustáceos zooplactónicos de lagos pouco profundos. Tese de Doutoramento, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal: 5-9
- Chinetti, C.; Fruchart, J.C.; Staels, B.; (2000) Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): Nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. Inflammation Research 49: 497-505
- Clader, P.C.; Grimble R.F.; (2002) Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. European Journal of Clinical Nutrition 56 (3): S14–S19
- Clements, W.; (2000) Integrating effects of contaminants across levels of biological organization: an overview. Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery 7(2): 113-116
- Colborn, T.; S. vom Saal, F.; Soto, A. S.; (1993) Developmental Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals in Wildlife and Humans, Environmental Health Perspectives 101(5): 378-384

Costau, C.; Chevillon, C.; Constant, R.; (2000) Resistance to xenobiotics and parasites: can we count the cost?. TREE 15(9): 378-383

Dalsgaard, J.; St. John, M.; Kattner, G.; Müller-Navarra, D.; Hagen, W.; (2003) Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment. Advances in Marine Biology 46: 225-340

Daughton, C.G.; (2004) Non-regulated water contaminants: emerging research. Environmental Impact Assessment Review 24: 711 –732

Davidson, L. A.; Wang, N.; Shah, M. S.; Lupton, J. R.; Ivanov, I.; Chapkin, R. S.; (2009) n-3 Polyunsaturated fatty acids modulate carcinogen-directed non-coding microRNA signatures in rat colon. Carcinogenesis 12 (30): 2077-2084

Desvillettes, C.; Bourdier, G.; Amblard, C.; Barth, B.; (1997) Use of fatty acids for the assessment of zooplankton grazing on bacteria, protozoans and microalgae. Freshwater Biology 38: 629-637

Diretiva 2009/127/CE do Parlamento e Conselho Europeu; (2009) Jornal Oficial da União Europeia-
acessível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:310:0029:0033:pt:PDF>

Diretiva 2009/128/CE Parlamento e Conselho Europeu; (2009) Jornal Oficial da União Europeia-
acessível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:309:0071:0086:PT:PDF>

Dobozy, V.A.; (2001) METOLACHLOR/S-METOLACHLOR Toxicology Disciplinary Chapter for the Tolerance Reassessment Eligibility Decision (TRED) Document. Health Effects Division Office of Pesticide Programs U.S. Environmental Protection Agency Arlington

Elert, E. V.; (2004) Food quality constraints in *Daphnia*: interspecific differences in the response to the absence of a long chain polyunsaturated fatty acid in the food source. Hydrobiology 526: 187-196

El-Sabaawi, R.; Dower, J.F.; Kainz, M.; Mazmumder, A.; (2009) Characterizing dietary variability and trophic positions of coastal calanoid copepods: insight from stable isotopes and fatty acids. Marine Biology 156: 225-237

Eurolex-<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:52001DC0262:P> -acedido em 26/2/2013

E X T O X N E T- <http://extoxnet.orst.edu/pips/metolach.htm>- acedido em 23/2/2013

Fent, K.; (2003) Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. Toxicology Letters 140–141(0): 353-365

Franks, F.; (2000) Origin and Distribution of Water in the Ecosphere: Water and Prehistoric Life Water: A Matrix of Life. Royal Society of Chemistry - Second Edition

Fry, D.M.; (1995) Reproductive Effects in Birds Exposed to Pesticides and Industrial Chemicals. Environmental Health Perspectives 103(7): 165-171

Gladyshev, M.; Sushchik, N. S.; Dubovskaya, O. P.; Makhutova, O. N.; Kalachova G. S.; (2006) Influence of sestonic elemental and essential fatty acid contents in a eutrophic reservoir in Siberia on population growth of *Daphnia* (*Longispina* group). Journal of plankton research 28(10) : 907-917

- Gonçalves, A.M.M.; Azeiteiro, U.M.; Pardal, M.A.; De Troch, M.; (2012) Fatty acid profiling reveals seasonal and spatial shifts in zooplankton diet in a temperate estuary. Estuarine, Coastal and Shelf Science 109:70–80
- Gonçalves, A.M.M.; Castro B.B.; Gonçalves F.; (2008) "Toxicity Effects of Sodium Chloride" in Azeiteiro, U.M.; Gonçalves, F.; Pereira, R.; Pereira, M.J.; Filho, W.L.; Morgado, F. Science and Environmental Education 27: 233-244
- Grandjean, P.; Andersen, E. W.; Budtz-Jorgensen, E.; Nielsen F.; Molbak K.; Weihe P.; Heilmann C.; (2012) Serum Vaccine antibody Concentrations in Children Exposed to Perfluorinated Compounds. Journal of the American Medical Association 307: 391-396
- Gulati, R.; Demott, W.; (1997) The role of food quality for zooplankton: remarks on the state-of-the-art, perspectives and priorities. Freshwater Biology 38: 753–768
- Harrison, R.M.; (1996) Pollution: causes, effects, and control. Royal Society of Chemistry - Second Edition
- Hedden, P.; (2002) The genes of the Green Revolution. TRENDS in Genetics 19 (1): 5-8
- Heming; T.A; Buddington, R.K.; (1988) "Yolk Absorption in Embryonic and Larval Fishes" in Fish Physiology 11(A): 408-437
- Hernández, F.G.; (2007) El papel de los biomarcadores en Toxicología Humana. Departamento de Medicina Legal y Toxicología Facultad de Medicina de la Universidad de Granada, Granada
- Karam, D.; Lara, F.R.; Cruz, M.B.; Filho, I.A.P.; Pereira, F.T.F.; (2003) " Características do Herbicida S-Metolacloro nas Culturas de Milho e Sorgo" in Circular Técnica 36: 65, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
- Kegley, S.E., Hill, B.R., Orme S., Choi A.H., (2011) PAN - Pesticide Database, Pesticide Action Network, North America (San Francisco, CA,), <http://www.pesticideinfo.org>.
- Kilham, S.S.; Kreeger, D.A.; Goulden, C.E.; Lynn, S.G.; (1997) Effects of algal food quality on fecundity and population growth rates of *Daphnia*. Freshwater Biology 38: 639-647
- Kris-Etherton, P.M.; Harris, W.S.; Appel, L.J.; (2003) Fish Consumption, Fish Oil, Omega-3 Fatty Acids, and Cardiovascular Disease. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 23: e20_e30
- Lands, W. E. M.; (2009) “Human life: Caught in the Food Web” in Arts, M.T., Bertt, M.T. and Kainz, M.J. Lipids in Aquatic Ecosystems: 327-347 Springer, New York.
- Lau, C.; Abbott, B. D.; Corton, J.; Cunningham, M.;(2010) PPARs and Xenobiotic-Induced Adverse Effects: Relevance to Human Health. PPAR Research:1-4
- López-Barea, J.; Pueyo, C.; (1998) Mutagen content and metabolic activation of promutagens by molluscs as biomarkers of marine pollution. Mutation Research 399: 3–15
- Liu, H.; Ye, W.; Zhan X.; Liu W.; (2006) A comparative study of rac- and s- metolachlor toxicity to *Daphnia magna*. Ecotoxicology and Environmental safety 63: 451-455

- Marques, C.R.; Pereira, R.; Gonçalves, F.; (2011) Toxicity evaluation of natural samples from the vicinity of rice fields using two trophic levels. Environmental Monitoring and Assessment 180: 521-536
- Masclaux, H.; Bec, A.; Kainz, M.J.; Desvillettes, C.; Jouve, L.; Bourdier, G.; (2009) Combined effects of food quality and temperature on somatic growth and reproduction of two freshwater cladocerans. Limnology and Oceanography 54(4): 1323-1332
- Merrington, G.; Winder, L.; Parkinson, R.; Redman, M.; (2002) Agricultural Pollution. SPON press.
- Moonen A.C.; Bàberi, P.; (2008) Functional biodiversity: An agroecosystem approach. Agriculture, Ecosystems & Environment 127(1): 7-21
- Mourente, G.; Odriozola, J.M.; (1990) Effect of broodstock diets on lipid classes and their fatty acid composition in eggs of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). Fish Physiology and Biochemistry 8(2): 93-101
- Murphy, P.J.; (2001) Xenobiotic metabolism: a look from the past to the future. Drug Metabolism and Disposition 29(6): 779-780
- Newman MC (1998). Fundamentals of ecotoxicology. Ann Harbor Press, U.S.A.
- Pérez, J.; Domingues, I.; Soares, A.M.V.M.; Loureiro, S.; (2011) Growth rate of *Pseudokirchneriella subcapitata* exposed to herbicides found in surface water in the Alqueva reservoir: a bottom-up approach using binary mixtures. Ecotoxicology 20: 1167- 1175.
- Pereira, J.A.; " Estrutura e Função dos Lípidos" in Quintas, A.; Halpern, M. J.; Freire, A. P.; (2008) Bioquímica - Organização Molecular da Vida Edições Lidel: 450-451, 453
- Pereira, J. L. L. E.; (2008) Variações populacionais de cladóceros sujeitos a diferentes condições de stress. Tese de Doutoramento, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal: 6-12
- Pereira, J.L.; Antunes, S.C.; Castro, B.B.; Marques, C.R.; Gonçalves, A.M.M.; Gonçalves, F.; Pereira, R.; (2009) Toxicity evaluation of three pesticides on non-target aquatic and soil organisms: commercial formulation versus active ingredient. Ecotoxicology 18: 455–463
- Pereira, R. S.; (2004) Identificação e caracterização das fontes de poluição em sistemas hídricos. IPH-UFRGS. 1(1): 20-36
- Perrat, E.; Couzinet-Mossion, A.; Fossi Tankoua, O.; Amiard-Triquet, C.; Wielgosz-Collin, G.; (2013) Variation of content of lipid classes, sterols and fatty acids in gonads and digestive glands of *Scrobicularia plana* in relation to environment pollution levels. Ecotoxicology and Environmental Safety 90: 112–120
- Peters, N. E., Meybeck, M.; Chapman, D. V.; (2006), Effects of Human Activities on Water Quality. Encyclopedia of Hydrological Sciences 3(8) : 1409-1425
- Peterson, D.E.; Thompson, C.R.; Regehr, D.L.; Khatib, K.; (2001) Herbicide Mode of Action, Kansas State University: 1-24

Petrusek, A.; Hobæk, A.; Nilssen, J.P.; Skage M.; Černý, M.; Brede N.; Schwenk K.; (2008) A taxonomic reappraisal of the European *Daphnia longispina* complex (Crustacea, Cladocera, Anomopoda). Zoologica Scripta 37 (5): 507-519

Pimentel, D.; (2005) Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States. Environment, Development and Sustainability 7: 229–252

Syngenta (2011) Primextra Gold TZ- - Ficha De Dados De Segurança. Syngenta syngenta.com/country/pt/pt/produtos/Proteccao_de_culturas/Herbicidas/Pages/PrimextraGoldTZ

Rattner, H.; (2010) Meio ambiente, saúde e desenvolvimento sustentável. Revista Espaço Acadêmico: 91-101

R.E.D. FACTS- Terbutylazine- (1995) Environmental Protection Agency, United States.- acessível em : <http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/factsheets/2645fact.pdf>

Regulamento de Execução (UE) N° 540/2011 da Comissão Europeia (2011) Jornal Oficial da União Europeia acessível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:153:0001:0186:PT:PDF>

Regulamento de Execução (UE) N° 820/2011 da Comissão Europeia (2011) Jornal Oficial da União Europeia acessível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:209:0018:0023:PT:PDF>

Regulamento de Execução (UE) N° 1197/2012 da Comissão Europeia Jornal Oficial da União Europeia acessível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2012:342:0027:0030:PT:PDF>

Renault, T.; (2011) "Effects of Pesticides on Marine Bivalves: What Do We Know and What Do We Need to Know?" in Stoytcheva, M.; Pesticides in the Modern World: 227-235

Review report for the active substance S-Metolachlor (2004) Standing Committee on the Food Chain and Animal Health view of the inclusion of S-Metolachlor in Annex I of Directive 91/414/EEC

Rivard, L.; (2003) Environmental Fate of Metolachlor. Department of Pesticide Regulation 1001 I Street Sacramento, CA 95812

Soares, W.L.; Porto, M.F.; (2007) Agricultural activity and environmental externality: an analysis of the use of pesticides in the Brazilian savannah. Ciência & Saúde Coletiva 12(1):131-143,

Silva, E.; Batista, S.; Caetano, L.; Cerejeira, M.J.; Chaves, M.; Jacobsen S.E.; (2011) Integrated approach for the quality assessment of freshwater resources in a vineyard area (South Portugal). Environmental Monitoring and Assessment 176: 331-341

Stampfli, N. C.; Knillmann S.; Liess M.; Beketov M.; (2011) Environmental context determines community sensitivity of freshwater zooplankton to a pesticide. Aquatic Toxicology 104: 116–124

Syngenta.com/country/pt/pt/produtos/Proteccao_de_culturas/Herbicidas/Pages/PrimextraGoldTZ-
acedido em 21/1/2013

European Commission Health & Consumer Protection Directorate General (2004) S-Metolachlor: 1-25; accessed in 23/9/2013:
http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/newactive/s_metolachlor.pdf

Taipale, S.; Kankaala, P.; Hämäläinen, H.; Jones, R.I.; (2009) Seasonal shifts in the diet of lake zooplankton revealed by phospholipid fatty acid analysis. Freshwater Biology 54: 90-104

Terbuthylazine (TBA) in Drinking-water. (1998) World Health Organization; Geneva, Guidelines for drinking-water quality, 2nd ed. Addendum to 2- acessível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/terbuthylazine.pdf

Testai, E.; (2002) "Basic Aspects of Toxicology" in Chyczewski, L.; Niklinski, J.; Pluygers E.; Endocrine Disrupters and Carcinogenic Risk Assessment. IOS press: 256-267

Ukpebor, J.; Llabjani, V.; Martin, F. L.; Halsall, C. J.; (2011) Sublethal genotoxicity and cell alterations by organophosphorus pesticides in MCF-7 cells: Implications for environmentally relevant concentrations. Environmental Toxicology and Chemistry 30: 632-639

van der Oost, R.; Beyer, J.; Vermeulen, N.P.E.; (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environmental Toxicology and Pharmacology 13: 57-149

Vasquez, B.L.; (1995) "Resistant to Most Insecticides" in University of Florida Book of Insect Records Department of Entomology & Nematology University of Florida, Gainesville, Florida: 34-36

Vilarinho, F.; (2011) Pesticidas - Instituto Nacional de Saúde. Acessível em : <http://repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/772/1/Pesticidas%202011.pdf>

Vulimiri, S. V.; Berger, A.; Sonawane, B.; (2011) The potential of metabolomic approaches for investigating mode(s) of action of xenobiotics: Case study with carbon tetrachloride. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 722 (2): 147-153

Watanabe, T.; Arakawa, T.; Kitajima, C.; Fujita, S.; (1984) Effect of nutritional quality of broodstock diet on reproduction of red sea bream. Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries 50: 495-501

Wolf, C. J.; Takaca, M. L.; Schmid, J. E.; Lau, C.; Abbott B. D.; (2008) Activation of Mouse and Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha by Perfluoroalkyl Acids of Different Functional Groups and Chain Lengths. Toxicological Sciences 106 (1): 162-171

Capítulo 1:
Acute and chronic responses of *Daphnia longispina* to commercial formulation
(Primextra ® Gold TZ) and active ingredient (S-metolachlor) of a herbicide

Introduction

Pesticides are commonly used worldwide to face the need of increasing and improving agricultural production (Alavanja 2009). Although the application of plant protection products occurs in the terrestrial environment, aquatic ecosystems are the ultimate receptors of many of these xenobiotics. The contamination of aquatic systems can occur via aerial spraying, leaching, runoff or accidental spills. The ecotoxicological effects of plant protection products affect multiple levels of biological organization, from the molecular level to the ecosystem level. Through disruption of key trophic web links, many of them affect non-target organisms, which may change the structure and functioning of the ecosystem (Clements 2000). Additionally, many of these contaminants have high lipophilicity, which can promote their bioaccumulation in food webs (Fent 2003).

In the pursuit for the most efficient pesticide, there is a wide availability of plant protection products, each one with its mechanism of action and subsequent potential toxicity to aquatic organisms. One of such xenobiotics is the pesticide Primextra® Gold TZ, manufactured by Syngenta AG, which is widely used because of its herbicidal properties. This pesticide is used in Portugal, where it is used for controlling weeds that emerge before corn plantules, but its active ingredients are used by Syngenta AG to synthesize other pesticides (Bicep II Magnum®, Gardo Gold®, Primagram Gold® and Primestra Gold®) used worldwide. This herbicide is composed of two active ingredients: S-metolachlor and terbuthylazine. Despite the processes targeted by active components are specific for some plant life forms, there is evidence that they are moderately toxic to many aquatic animals (Rivard 2003), which is especially relevant if its potential targets include keystone species, such as *Daphnia* spp. (used in this study; see below).

S-metolachlor is the active ingredient that makes up the majority of the herbicide being studied, and this compound is a potential danger to the environment and aquatic ecosystems (Liu *et al.* 2006). It is a component of many other herbicides and its use is still authorized by most of the countries in the European Union (EU) (Regulation (EU) No 540/2011). Metolachlor was developed to control grass weeds following pre-emergence application. According to USDA (1997) and Liu (2004), metolachlor is the most widely used herbicide both in China and USA. Metolachlor was initially introduced into market in two forms (rac-metolachlor and S-metolachlor); S-metolachlor has in our days replaced the rac-metolachlor, because it was more effective than its predecessor (Liu *et al.* 2006). S-metolachlor, 2-Chloro-N-(2-ethyl-6-methylphenyl)-N-[(1S)-2-methoxy-1-methylethyl]acetamide, is part of the family of chloroacetamides (Kegley *et al.* 2011), whose mode of action consists in inhibiting several biological processes (essentially biosynthesis) acting on meristematic zones of plants (Karam *et al.* 2003).

Despite all the existing regulations, agrochemicals can affect non-target organisms. Commercial formulations comprehend active ingredients plus coadjuvant substances (supposedly inert) that can potentiate the effects of the active ingredient, turning the

commercial formulations more toxic than the isolated active ingredient (Axelard et al. 2002). Several studies (Cedergreen & Streibig 2005; Pereira et al. 2009; Dobšíková *et al.* 2011) have been made in this field, pointing out that commercial formulations are generally more toxic than active ingredient. This may happen either due to the interaction of active ingredients or due to interaction of the active ingredient(s) with the supposedly inert compounds added to the commercial mix (Pereira et al. 2009).

Daphnia longispina (O. F. Müller, 1776) is a widespread and common species in Europe, often found in Portuguese freshwaters (mainly in lacustrine and lagoon systems). This species belongs to the sub-genus *Hyalodaphnia*, which is one of the three known sub-genera (Forró *et al.* 2008). This species dwells in lentic aquatic ecosystems, playing a key role in the food web structure, as a link between primary producers (phytoplankton) a higher rank consumers (namely fish), being the main responsible for the transfer of mass and energy in the trophic web (Caramujo & Boavida 2000). It is also a strong regulator of water transparency (Castro & Gonçalves 2007, and references therein), and some authors (e.g. Colomer 1996) have emphasized its potential as an indicator species in terms of water quality.

Due to the proximity of crop production fields to aquatic ecosystems, agrochemicals – such as Primextra® Gold TZ and S-metolachlor – may end up in the water through leaching, accidental spill and careless applications. This *Daphnia* species, as well as others, may be affected, which should draw attention to environmental managers, given their importance in this kind of aquatic ecosystems. Bearing this in mind, the goal of this study was to determine the acute and chronic effects of the commercial formulation (Primextra® Gold TZ) and its main active ingredient (S-metolachlor) in *Daphnia longispina*.

Material & methods

Daphnid cultures

Monoclonal cultures of *Daphnia longispina* (clone EM7, *sensu* Antunes *et al.* 2003) were reared continuously in the lab as synchronized cohorts, under a 16:8 h light:dark photoperiod, at a temperature of 20±2°C, in synthetic ASTM hardwater medium (ASTM 1980) supplied with an organic additive (described in Baird *et al.* 1989). Culture medium was renewed every other day and the organisms were fed with *Pseudokirchneriella subcapitata* at a ration of 1.5×10^5 cell/mL every two days. For further details on rearing procedures, see Antunes *et al.* (2004) and Loureiro *et al.* (2011; 2012).

Acute tests

Tests were performed according to standard protocols (ISO 1996; OECD 2000; EPA 2002) under the same temperature and photoperiod regimes as described for rearing procedures. *Daphnia longispina* experiments were initiated with neonates (< 24 h old) obtained from

the same bulk cultures, born between the 3rd and 5th broods. The pesticide and active ingredient solutions were obtained by successive dilutions of a stock solution of Primextra® Gold TZ or S-metolachlor in distilled water. Based on literature data and preliminary trials, we used concentrations ranging from 8.00 to 28.13 mg/L S-metolachlor for Primextra® Gold TZ and from 11.5 to 26.5 mg/L for S-metolachlor. The culture medium was used as the negative control treatment. Tests were carried out in glass beakers (four per treatment) containing 10 mL of test solutions. In both assays, a static design was employed, using 20 animals (randomly divided into four groups of five animals) per control and per toxicant concentration. Daphnids were exposed to the different toxicant concentrations during 48 h without food or organic extract. Vessels were checked for immobilized individuals, at 24 h and 48 h, for posterior determination of EC₅₀.

Chronic tests

Chronic tests (Primextra® Gold TZ and S-metolachlor) were conducted in accordance with standardized protocols (OECD 1998; ISO 2000; OECD 2000; EPA 2002). Each chronic assay was composed by 7 treatments (one negative control plus six nominal concentrations of respective toxicant) with a concentration range of 2.50 to 5.03 mg of S-metolachlor/L for the commercial formulation and 4.00 to 12.21 mg S-metolachlor/L. Ten replicates per treatment were used with one daphnid per glass breaker, filled with 50 mL of culture medium. Daphnids were fed daily with *P. subcapitata* at a rate of 1.5×10^5 cell/mL and transferred to freshly prepared test solutions every other day. Cladocerans were checked every day at the same approximated hour for mortality and reproductive state. When neonates were released, they were counted and discarded. A life history table was built with the mortality and fecundity this data was integrated for the estimation of the per capita rate of population increase (r) through the Euler- Lotka equation:

$$1 = \sum_{x=0}^n e^{-rx} l_x m_x$$

Where e is the discrete growth rate, r stands for the per capita rate of population increase (day⁻¹), x for the age class (days), l_x for the probability of surviving to age x (0... n), and m_x for the fecundity at age x . For statistical purposes, replicate pseudo-values for r were generated with a jack-knife technique (Meyer et al. 1986).

Statistical analysis

Probit analysis (Finney 1971) was used to estimate the concentration which caused 50% immobilization (EC₅₀) of daphnids in acute tests, and corresponding 95% confidence intervals. Non-linear regression was used to estimate the concentration that caused 50% and 20% reduction in fecundity (EC₅₀ and EC₂₀) of daphnids in chronic tests, as well as

corresponding 95% confidence intervals. One-way analysis of variance (ANOVA), followed by Dunnett's test, was applied to each endpoint of the chronic assays to assign statistical differences between the concentrations tested and the control.

Results

The acute immobilization tests showed that *D. longispina* was more tolerant to the commercial formulation than its active ingredient. In fact, the acute EC₅₀ value of the active ingredient (18.71 mg/L) was lower than the corresponding value for the commercial formulation (23.53 mg/L), despite being in the same order of magnitude. To allow proper comparison, we always refer to concentrations in mg/L of S-metolachlor, independently of presenting the results for the commercial formulation or active ingredient (Table 1).

Table 1: Acute EC₅₀ values of Primextra® Gold TZ and S-metolachlor for *D. longispina*, and respective 95% confidence limits (in brackets).

Tested compound		Total active ingredients	S-metolachlor
Primextra® GOLD TZ (S-metolachlor + terbutylazine)		37.65 mg/L	23.53 mg/L
	EC ₅₀	(32.89 – 46.21)	(20.60 – 28.90)
		18.71 mg/L	
S-metolachlor	EC ₅₀	(18.19 – 19.25)	

The two chronic assays fulfilled the validity criteria outlined by OECD: the mortality of the parent animals (female *Daphnia*) did not exceed 20% at the end of the test. In both chronic assays, the treatment ranges used were below the acute EC₅₀s.

With increasing toxicant concentration, increasing mortality was observed. Reproductive parameters were also affected with the increase of toxicant in both studied cases, showing a significant decrease in the measured parameters when comparing with the control treatment (fig. 1 and fig. 2).

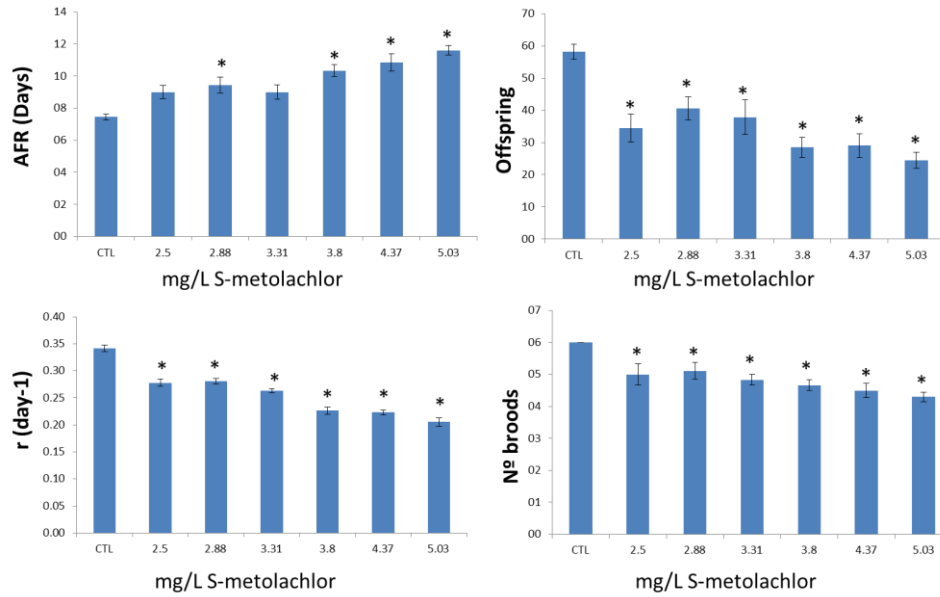


Fig.1- Effects of the commercial formulation Primextra® Gold TZ on reproductive and populational parameters (age at first reproduction - AFR, total number of offspring, intrinsic rate of population increase (r), number of broods) monitored in the 21 d chronic assay with *Daphnia longispina*. In each case, the mean and respective standard error are presented, as well as significant differences from control (CTL). Concentrations of commercial formulation are presented in mg/L of S-metolachlor.

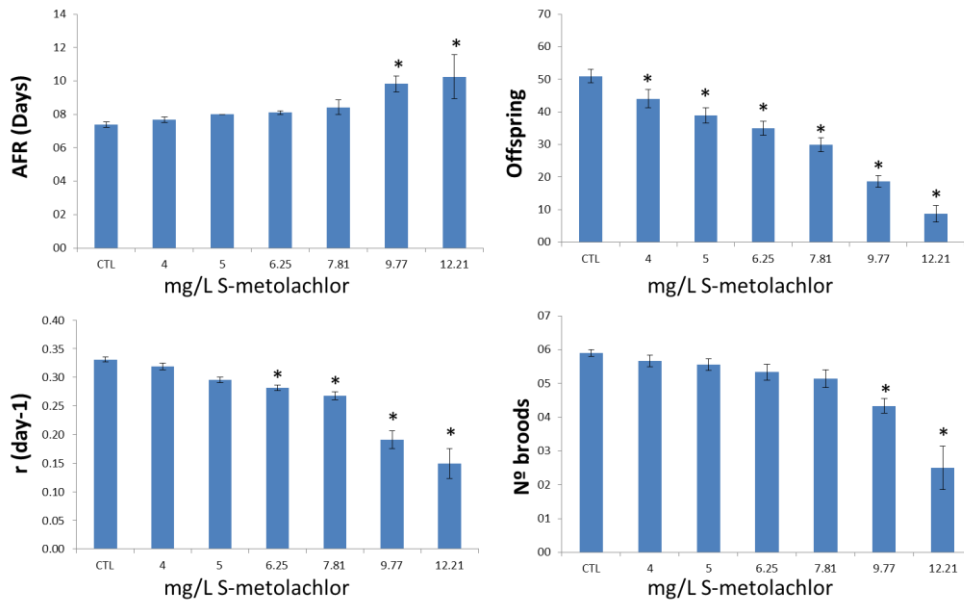


Fig.2- Effects of the active ingredient S-metolachlor on reproductive and populational parameters (age at first reproduction - AFR, total of offspring, intrinsic rate of population increase (r), number of broods) monitored in the 21 d chronic assay with *Daphnia longispina*. In each case, the mean and respective standard error are presented, as well as significant differences from the control (CTL). Concentrations of active ingredient are presented in mg/L of S-metolachlor.

No mortality was observed for the commercial formulation in the control treatment or at 4.00 mg/L, 6.08 mg/L and 8.05 mg/L. At 4.60 mg/L and 5.29 mg/L we observed 10% mortality, whereas 30% mortality was registered at 7.00 mg/L. In average mortality started in the tenth day of the assay.

No mortality was observed for the active ingredient in the control treatment. In the first three S-metolachlor treatments (4.00, 5.00 and 6.25 mg/L) there was 10% mortality. At 7.81 mg/L, mortality was 30%, whereas 40% mortality was registered in the 9.77 mg/L. Finally, 60% mortality was observed in the 12.21 mg/L treatment. In average, mortality started in the fourteenth day of the chronic assay.

The reproductive EC_{50} was lower for the commercial formulation than the active ingredient (Table 2). Therefore, *D. longispina* was more sensitive to the commercial formulation, unlike in the acute tests.

Table 2: Chronic EC_{50} values of Primextra® Gold TZ and S-metolachlor for *D. longispina*, and respective 95% confidence limits (in brackets).

Tested compound		Total active ingredients	S-metolachlor
Primextra® GOLD TZ (S-metolachlor + terbuthylazine)	EC_{50}	6.58 mg/L (6.16-7.11)	4.11 mg/L (3.85- 4.44)
S-metolachlor	EC_{50}	8.24 mg/L (7.38-9.10)	

Discussion

The purpose of the study was to determine the toxicity of the herbicide Primextra® Gold TZ and S-metolachlor for the species *D. longispina* (O. F. Müller, 1776), since this species is widely spread in Portuguese aquatic ecosystems.

The acute assays pointed out the active ingredient as the most toxic compound of both assays, but both values remained lower than the S-metolachlor EC_{50} value found in the literature (25.1 mg/L for *D. magna* - Rivard 2003). However, *D. magna* is generally less sensitive than *D. longispina* (Gonçalves *et al.* 2007), which could explain the observed differences. On the other hand, the chronic assay revealed that the formulation was more toxic than the isolated active ingredient; our values were lower than the value presented in literature (10 mg/L for *D. magna* - Liu *et al.* 2006) but higher than the values obtained for the aquatic plant *Lemna gibba* (0.023 mg/L- SANCO/1426/2001 2004) the higher sensitivity of *Lemna gibba* is explain by the target mechanism of the this active ingredient. According to Cerejeira *et al.* (2003), the amount of metolachlor found in Portuguese surface waters is

very low (0.056 mg/L). Therefore, the concentrations used in our study could correspond to a catastrophic contamination event or sporadic event of herbicide application. However, the values reported by Cerejeira *et al.* (2003) surpassed the European threshold (0.0001 mg/L) for chloroacetamides in drinking water (Peña *et al.* 2013). In both assays, we would expect the commercial formulation to be more toxic, because of the presence of other toxic substances, such as terbuthylazine (herbicide) and coadjuvants (Pereira *et al.* 2009). Since most active ingredients are insoluble in water, the formulations of pesticides are also composed by a variety of solvents and potentiators where any component may interact with the other. Theoretically, these interactions may lead to potentiation effects (synergism) or weakening of the effects (antagonism) (Axelard *et al.* 2002). In our case, the contradictory results (acute vs. chronic) may be explained by antagonistic effects between compounds of the commercial formulation due to concentrations effects (Pérez *et al.* 2011). In these relations between compounds it has been proved that the ratio of concentrations is very important. For example, using the two active ingredients of the commercial formulation studied (S-metolachlor and terbuthylazine), solutions with a higher concentration of S-metolachlor and lower concentration of terbuthylazine lead to synergistic phenomena, while solutions with higher concentrations of terbuthylazine and lower concentrations of S-metolachlor induced antagonistic effects (Pérez *et al.* 2011; Dobšíková *et al.* 2011).

Primextra® Gold TZ is much more toxic than S-metolachlor in isolation, as shown in other studies (Junghans *et al.* 2003; Syberg *et al.* 2009; Pérez *et al.* 2011). The combinations of two or more active ingredients can be more lethal to non-target organisms than the active ingredient in isolation, despite the specificity of their mode of action, and one also must consider the possible effects of the adjuvants. S-metolachlor can disrupt two mechanisms: protein synthesis and fatty acid metabolism (Rivard 2003). The disruption of two separated and very important metabolic pathways can explain the lower fecundity observed (Perrat *et al.* 2013) and the reduced performance, observed in the significant decrease in the number of offspring and intrinsic rate of population increase (r). Fatty acids, for example, are known to be of paramount importance to daphnids (Brett & Müller-Navarra 1997) and neonate development. The action of S-metolachlor remains unclear in protein synthesis, however a recent study using immortalized human liver cells showed that ingredients-metolachlor can decrease the abundance of the cyclin A transcript, those affecting the amount of this protein essential for the regulation of the mitosis process (Hartnett *et al.* 2013). The disruption of fatty acid metabolism is highly prejudicial since fatty acids are used as energy source, structural cell support and other cell mechanisms. For oviparous life forms, like *Daphnia*, the development of the embryos is completely dependent of the amount and quality of the nutrient that the eggs carries (Mourete *et al.* 1990). In particular, there are essential fatty acids (EFA) that must be acquired in the diet of heterotrophic organisms. These EFA are unsaturated fatty acids (MUFA, PUFA and HUFA), of which we can highlight the fatty acids of the omega 3 (EPA and DHA) and omega 6 (linoleic acid and arachidonic acid) groups (Dalsgaard *et al.* 2003), which play an

important a role as precursor of hormones and in signaling (Brett & Muller-Navarra 1997). Ahlgren *et al.* (1990) showed that daphnids that had a higher intake of EPA and DHA showed a better growth rate. This suggests that fatty acids are a key nutritional constituent of zooplankton diets (Brett & Muller-Navarra 1997). Since S-metolachlor inhibits the enzyme elongase (He *et al.* 2013), which allows producing long chain fatty acids (like EPA and DHA), this could lead to lower performance of zooplankters, especially if their nutritional uptake of long chain fatty acids is low.

Despite the ability to produce EPA and DHA by conversion of linoleic acid (C18:2n6t), this capacity is insufficient to support high growth and reproduction rates (Dalsgaard *et al.* 2003). Further studies in this field showed that the daphnid fatty acid composition reflects the fatty acid composition of their diet, therefore supporting the idea that if their diet is poor in EPA and DHA, it is unlikely that they can maintain high growth and reproduction rates (Brett *et al.* 2006). It is unclear whether this is the underlying mechanism explaining the inferior performance of daphnids under toxicant stress.

Conclusion

Primextra® Gold TZ, which has S-metolachlor in its composition, has proven to be more toxic than S-metolachlor alone, since reproductive parameters have been altered by lower equivalent concentrations of the commercial formulation. This is valid for lower, and more environmentally relevant concentrations of the xenobiotic, as the opposite result was observed for acute exposures. This allows us to say that Primextra® Gold TZ can endanger the aquatic ecosystems in the surroundings of agriculture field, by affecting important non-target species that live in freshwaters. S-metolachlor presents the ability of disturbing fatty acids metabolism and further studies should be made to investigate whether S-metolachlor can lead to changes in daphnid fatty acid profiles.

References

- Ahlgren, G.; Lundstedt, L.; Brett, M.; Forsberg, C.; (1990) Lipid composition and food quality of some freshwater phytoplankton for cladoceran zooplankters. Journal of Plankton Research 12 (4): 809-818
- Alavanja, M.C.R.; (2009) Pesticides Use and Exposure Extensive Worldwide. Reviews on Environmental Health 24(4): 303–309
- Antunes, S.C.; Castro, B.B.; Gonçalves, F.; (2003) Chronic responses of different clones of *Daphnia longispina* to different food-levels. Acta Oecologica 24: S325-S332
- Antunes, S.C.; Castro, B.B.; Gonçalves, F.; (2004) Effect of food level on the acute and chronic responses of daphnids to lindane. Environmental Pollution 127: 367-375.
- Axelard, J.C.; Howard, C.V.; McLean, W.G.; (2002) Interactions between pesticides and components of pesticide formulations in an in vitro neurotoxicity test. Toxicology 173: 259–268
- Brett, M.T.; Müller-Navarra, D.C.; (1997) The role of highly unsaturated fatty acids in aquatic foodweb processes. Freshwater Biology 38: 483-499
- Brett, M.T.; Müller-Navarra, D.C.; Ballantyne, A.P.; Ravet, J.L.; Goldman, C.R.; (2006) *Daphnia* fatty acid composition reflects that of their diet. Limnology and Oceanography 51(5): 2428-2437
- Caramujo M.J.; & Boavida M.J.; (2000). The crustacean communities of river Tagus reservoirs: zooplankton structure as reservoir trophic state indicator. Limnetica 18:37-56.
- Castro, B.B.; Gonçalves, F.; (2007) Seasonal dynamics of the crustacean zooplankton of a shallow eutrophic lake from the Mediterranean region. Fundamental and Applied Limnology - Archiv für Hydrobiologie. 169: 189-202.
- Cedergreen, N.; Streibig, J.; (2005) The toxicity of herbicides to non-target aquatic plants and algae: assessment of predictive factors and hazard. Pest Management Science 61:1152–1160
- Cerejeira, M.J.; Viana, P.; Batista, S.; Pereira, T.; Silva, E.; Valério, M.J.; Silva, A.; Ferreira, M.; Silva-Fernandes, A.M.; (2003) Pesticides in Portuguese surface and ground waters. Water Research 37: 1055–1063
- Clements, W.; (2000) Integrating effects of contaminants across levels of biological organization: an overview. Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery 7(2): 113-116
- Colomer, M.G.S.; (1996). El uso del zooplancton como indicador biológico de la calidad del agua en 26 embalses españoles. Ingeniería Civil 105:55-64.
- Dalsgaard, J.; St. John, M.; Kattner, G.; Müller-Navarra, D.; Hagen, W.; (2003) Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment. Advances in Marine Biology 46: 225-340
- Dobšíková, R.; Blahová, J.; Modrá, H.; Škorič, M.; Svobodová, Z.; (2011) The effect of acute exposure to herbicide Gardoprim Plus Gold 500 SC on haematological and biochemical indicators and histopathological changes in common carp (*Cyprinus carpio* L.). Acta Veterinaria Brno 80: 359-363

EPA (2002). Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. 4th edition. EPA-821-R-02-013. (US Environment Protection Agency: Washington, USA.)

European Commission (2011). Commission Implementing Regulation (EU) No. 540/2011 – implementing Regulation (EC) No. 1107/2009 of the European Parliament and of the Council as regards the list of approved active substances. Official Journal of the European Union L 153, 11 June 2011, pp. 1-186.

Fent, K.; (2003) Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. Toxicology Letters 140–141(0): 353-365

Finney, D. J.; (1971). Probit analysis. Cambridge University Press, Cambridge. p 350

Forró, L.; Korovchinsky, N.M.; Kotov, A.A.; Petrusek, A.; (2008) Global diversity of Cladocerans (Cladocera; Crustacea) in freshwater. Developments in Hydrobiology 198: 177-184

Gonçalves, A.M.M.; Castro, B.B.; Pardal, M.A.; Gonçalves, F.; (2007) Salinity effects on survival and life history of two freshwater cladocerans (*Daphnia magna* and *Daphnia longispina*). Annales de Limnologie - International Journal of Limnology 43: 13-20.

Hartnett, S.; Musah, S.; Dhanwada, K.R.; (2013) Cellular effects of metolachlor exposure on human liver (HepG2) cells. Chemosphere 90(3): 1258-1266

He, H.; Chen, G.; Yu, J.; He, J.; Huang, X.; Li, S.; Guo, Q.; Yu, T.; Li, H.; (2013) Individual and Joint Toxicity of Three Chloroacetanilide Herbicides to Freshwater Cladoceran *Daphnia carinata*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 90: 344-350

ISO (2000). Water quality: determination of long term toxicity of substances to *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). ISO International Standard 10706. (International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland.)

Junghans, M.; Backaus, T.; Faust, M.; Scholze, M.; Grimme, L.H.; (2003) Preditability of combined effects of eight chloroacetanilide herbicides on algal reproduction. Pest Management Science 59: 1101-1110

Karam, D.; Lara, F.R.; Cruz, M.B.; Filho, I.A.P.; Pereira, F.T.F.; (2003) " Características do Herbicida S-Metolaclo-ro nas Culturas de Milho e Sorgo" in Circular Técnica 36.p 65, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Kegley, S.E.; Hill, B.R.; Orme S.; Choi A.H.; (2011) PAN - Pesticide Database, Pesticide Action Network, North America (San Francisco, CA,), <http://www.pesticideinfo.org>.

Loureiro, C.; Castro, B.B.; Pereira, J.L.; Gonçalves, F.; (2011) Performance of standard media in toxicological assessments with *Daphnia magna*: chelators and ionic composition versus metal toxicity. Ecotoxicology 20(1): 139-148

Loureiro, C.; Castro, B.B.; Claro, M.T.; Alves, A.; Pedrosa, M.A.; Gonçalves, F.; (2012) Genetic variability in the tolerance of natural populations of *Simocephalus vetulus* (Müller, 1776) to lethal levels of sodium chloride. Annales de Limnologie - International Journal of Limnology 48: 95-103

- Liu, H. J.; Liu, W. P.; Chen, A. P.; Yang, W.C.; (2004) The reaction mechanism of metolachlor and S-isomer with urease. Spectroscopy and Spectral Analysis. 24: 166-168
- Liu, H.; Ye, W.; Zhan, X.; Liu, W.; (2006) A comparative study of rac- and S-metolachlor toxicity to *Daphnia magna*. Ecotoxicology and Environmental Safety 63: 451-455
- Meyer, J.S.; Ingersoll, C.G.; McDonald, L.L.; Boyce, M.S.; (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs Bootstrap techniques. Ecology 67: 1156-1166.
- Mourente, G.; Odriozola, J.M.; (1990) Effect of broodstock diets on lipid classes and their fatty acid composition in eggs of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). Fish Physiology and Biochemistry 8(2): 93-101
- OECD (1998). *Daphnia magna* reproduction test. Test guideline 211. (Organization for the Economic Cooperation and Development: Paris, France.)
- OECD (2000). *Daphnia* sp., acute immobilisation test. Revised proposal for updating guideline 202. (Organization for the Economic Cooperation and Development: Paris, France.).
- Peña, D.; Albarrán, Á.; López-Piñeiro, A.; Rato-Nunes, J.M.; Sánchez-Llerena, J.; Becerra, D.; (2013) Impact of oiled and de-oiled olive mill waste amendments on the sorption, leaching, and persistence of S-metolachlor in a calcareous clay soil. Journal of Environmental Science and Health 48 (B): 767–775
- Pereira J.L., Antunes S.C., Castro B.B., Marques C.R., Gonçalves A.M.M., Gonçalves F., Pereira R. (2009) Toxicity evaluation of three pesticides on non-target aquatic and soil organisms: commercial formulation versus active ingredient. Ecotoxicology 18 (4): 455-463.
- Pérez, J.; Domingues I.; Soares, A.M.V.M.; Loureiro, S.; (2011) Growth rate of *Pseudokirchneriella subcapitata* exposed to herbicides found in surface waters in the Alqueva reservoir (Portugal): a bottom-up approach using binary mixtures. Ecotoxicology 20: 1167-1175
- Perrat, E.; Couzinet-Mossion, A.; Fossi Tankoua, O.; Amiard-Triquet, C.; Wielgosz-Collin, G.; (2013) Variation of content of lipid classes, sterols and fatty acids in gonads and digestive glands of *Scrobicularia plana* in relation to environment pollution levels. Ecotoxicology and Environmental Safety 90: 112–120
- Sygenta (2011) Primextra Gold TZ- - Ficha De Dados De Segurança. Sygenta sygenta.com/country/pt/pt/produtos/Proteccao_de_culturas/Herbicidas/Pages/PrimextraGoldTZ
- Rivard, L.; (2003) Environmental Fate of Metolachlor. Department of Pesticide Regulation 1001 I Street Sacramento, CA 95812
- European Commission Health & Consumer Protection Directorate General (2004) S-Metolachlor: 1-25; accessed in 23/9/2013: http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/newactive/s_metolachlor.pdf
- Syberg, K.; Jensen, T.S.; Cedergreen, N.; Rank, J.; (2009) On the use of mixture toxicity assessment in reach and water framework directive: a review. Human Ecology Risk Assessment International Journal 15(6): 1257-1272

Syngenta AG. (2013) Primextra Gold TZ
syngenta.com/country/pt/pt/produtos/Proteccao_de_culturas/Herbicidas/Pages/PrimextraGoldTZ-
acessed 21/1/2013

USDA; (1997) The acetanilide herbicides: alachlor, metolachlor and acetochlor, Office of Pesticide
program, Washington DC., 6 August

Capítulo 2:
**Multigenerational effects of S-metolachlor in experimental
microcosms: population responses *versus* fatty acid profiles of
*Daphnia longispina***

Introduction

The species *Daphnia longispina* belongs to the freshwater zooplankton, which acts as a very important link between producers (phytoplankton) and other consumers of the aquatic freshwater food web (Forró *et al.* 2008). Due to its importance in freshwater ecosystems, disturbance in population's growth rate may lead to an unbalance in the ecosystem, since the transfer of mass and energy in the food web would be highly compromised (Caramujo & Boavida 2000). It is therefore an important and sensitive ecoreceptor of contaminants, namely agrochemicals that find their way to aquatic systems (such as S-metolachlor – see chapter 1).

S-metolachlor (2-Chloro-N-(2-ethyl-6-methylphenyl)-N-[(1S)-2-methoxy-1-methylethyl]acetamide) belongs to the family of chloroacetamides (Kegley *et al.* 2011). S-metolachlor is a pre-emergence herbicide for the control of annual grasses and broad leaf weeds. It acts by inhibiting elongase, which is responsible for the elongation of very long-chain fatty acids (VLCFAs) by inhibition of the expression of FAE1 gene (Trenkamp *et al.* 2004), and geranylgeranyl pyrophosphate cyclisation enzymes (He *et al.* 2013) responsible to the transformation of geranylgeranyl pyrophosphate in β -carotene and α -carotene (Cunningham *et al.* 1996). The disruption of the β -carotene production, leads to plants with higher predisposition to oxidative stress (Warner & Frankel 1987). The inhibition of the elongation of VLCFAs can impair the synthesis of seed storage triacylglycerols, epicuticular waxes, and sphingolipids (Roudier *et al.* 2010). This active ingredient is used in a large number of commercial formulations. In a previous study (see chapter 1), we found that this herbicide (S-metolachlor) caused reproductive impairment in *Daphnia longispina*. Given the xenobiotic's mode of action (biosynthesis inhibition, with interference in lipid and protein metabolism), we suggested that this active ingredient could affect the lipid (fatty acids – FA) profile of this model species.

Fatty acids (FA) are very important molecules that are necessary for the production and permeability of cell membrane, and they are the main components of lipids (Pasquaud *et al.* 2007). They also act as gene transcription factors (Benatti *et al.* 2004 and Davidson *et al.* 2009), activators of cellular pathways (e.g. protein kinase C; Stahl 2004), and they are used as fuel in all metabolic systems at all trophic levels, having an important role on neural levels of biochemical and physiological response (Arts *et al.* 2009). FA are divided in saturated (SFA) and unsaturated (UFA), depending on the absence or presence of one or more double bonds between carbon atoms. The UFA may additionally be divided into monounsaturated fatty acids (MUFA), highly unsaturated fatty acids (HUFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA) (Dalsgaard *et al.* 2003). Brett and Müller-Navarra (1997) pointed out that PUFA are almost exclusively synthesized by plants, with animals being able of converting polyunsaturated fatty acids by elongation or desaturation, and only a few could synthesize this type of fatty acids. They also pointed that PUFA play an important role in the organism, regulating cell membranes properties, serving as precursors of important hormones and being essential to the organisms. HUFA, which may be

considered a branch of PUFA, are nutritional key constituents of zooplankton diet and may determine the energetic efficiency across the plant-animal interface, in aquatic pelagic food webs (Perhar & Arhonditsis 2012). Demott and Müller-Navarra (1997) demonstrated that zooplankton fed with high amounts of HUFA presented higher growth rate, thus strengthening the importance of fatty acids as ecophysiological indicators.

In oviparous organisms, the development of the embryos is fully dependent of the type and amount of FA present in the egg flock, stored as triaglycerol (Mourete *et al.* 1990). The amount of ω 3 FA stored in triaglycerol is very important since this will determine the cell membrane fluidity and allow the binding of enzyme membranes with cellular functions (Bell *et. al* 1986). High ω 3 FA presence in eggs is considered a quality marker of the egg, however when the content of ω 6 FA is higher than ω 3 FA it may indicate low egg quality (Watanabe *et al.* 1984). Desvilletes *et al.* (1997) demonstrated that FA could be used as biomarkers to track zooplankton diets, which has been corroborated by Brett *et al.* (2006).

Several studies have documented xenobiotic-induced changes in FA and lipid profiles (Wendel 1987; Ateşşahin *et al.* 2006; Craig *et al.* 2006). Rosas *et al.* (1980) have shown that *Escherichia coli* use atrazine as carbon subtract, thus leading to saturation of fatty acid membranes. This process is a well known reaction of bacteria against membrane-active substances, such as organic solvents or aromatic compounds (Laura *et al.* 1996). Lipid saturation appears as a general response to the presence of xenobiotics in bacteria (Lecher *et al.* 2011) whereas in higher organisms lipid peroxidation appears to be the main consequence. A study performed in Wistar rats showed that dimethoate increased the cytochrome P450 and lipid peroxidation, leading to damage of the PUFA present in the brain cells (Sharma *et al.* 2005). Despite the amount of information for these groups of organisms (e.g. bacteria), data about alteration of FA profiles promoted by xenobiotics in daphnids appear to remains scarce.

Bearing this in mind, the main goals of this study were:

- To determine and identify qualitative and quantitative changes in fatty acid profiles of *D. longispina* after exposure to S-metolachlor and to evaluate potential multigenerational post-exposure effects to S-metolachlor
- To relate variations in the profile of fatty acids with effects at the population level.

Material & methods

Test organisms and chemicals

Monoclonal cultures of *Daphnia longispina* EM7 (Antunes *et al.* 2003) were reared continuously in the lab, under a 16:8 h light:dark photoperiod, at a temperature of $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, in synthetic ASTM hardwater medium (ASTM 1980) supplied with an organic additive

extracted from the algae *Ascophyllum nodosum* (Baird *et al.* 1989). Culture was renewed every other day and the organisms were fed with *Pseudokirchneriella subcapitata* at a ration of 1.5×10^5 cell/mL. Test organisms (< 24 h old neonates) were selected from the third to the fifth broods from the above mentioned cultures.

S-metolachlor (2-Chloro-N-(2-ethyl-6-methylphenyl)-N-[(1S)-2-methoxy-1-methylethyl]acetamide – Table 1) was acquired from Sigma-Aldrich (Germany). Stock solutions of the herbicide were prepared in distilled water before each medium change. The appropriate amounts of the stock solution were introduced into culture medium to produce the final concentrations of the toxicity test.

Table 1- Data on S-metolachlor

CAS number	Empirical formula	Molecular weight	Water solubility	Adsorption Coefficient
87392-12-9	C ₁₅ H ₂₂ ClNO ₂	283.79	480.00 mg/l	185.00 Koc

Source: <http://www.sigmaaldrich.com/portugal.htm>; Kegley *et al.* 2011

Experimental design

The experimental procedure used for testing the effects of S-metolachlor in *Daphnia* populations had two different phases. In phase 1, 40 *Daphnia* neonates (F₀ generation) were exposed in glass beakers with 400 ml of corresponding test solution, in four experimental treatments: 1) a negative control, consisting of uncontaminated culture medium (see above); 2) a low level of S-metolachlor (3.33 mg/L), corresponding to the LOEC value obtained in reproduction tests (see chapter 1); 3) an intermediate level (5.00 mg/L), which corresponds to the reproductive EC₂₀; 4) a high level (7.50 mg/L), which is close to the reproductive EC₅₀ (8.24 mg/L). These toxicant levels were separated by a factor of 1.5×. All treatments were replicated six times, with the glass beaker as the experimental unit; later in the experiment, individuals of two beakers were pooled in a single sample for fatty acid (FA) analysis (i.e. there were only three experimental units for FA analysis). Daphnids were fed daily with *P. subcapitata* at a ration of 0.75×10^5 cell/ml and transferred to freshly prepared test solutions every three days. Beakers were checked every day at the same approximated hour for mortality and reproductive state (presence of offspring). Neonates from the first clutch were counted and isolated for FA analysis (see below and Fig. 1). Neonates from the second clutch were counted and transferred to new beakers, thus starting phase 2 (F₁ generation – see below). After all mothers had released the second clutch, they were also isolated for FA analysis (Fig. 1).

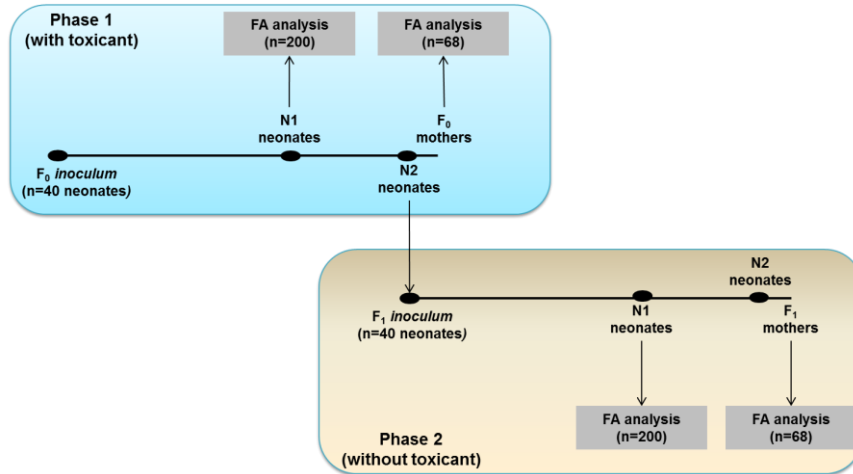


Fig. 1- Experimental design used for assessing potential multigenerational effects of S-metolachlor in population parameters and FA profiles.

Phase 2 was similar to phase 1, except that it was composed by four treatments with no addition of S-metolachlor (Fig. 1). In phase 2, neonates of the F1 generation were allowed to grow and reproduce in control (uncontaminated) conditions, after maternal exposure to four levels of S-metolachlor for one generation (phase 1). To do so, daphniids from each glass beaker originated new experimental populations, initiated with 40 neonates from the second clutch of the F₀ mothers. As in phase 1, all treatments were replicated three times, with each replicate consisting of two glass beakers; daphniids were fed at the same ration, and medium renewal occurred at the same periodicity. Similarly to phase 1, FA analysis was performed in offspring from the first clutch and in mothers that had released their second clutch (Fig. 1).

Measured parameters

The following population parameters were determined in each of the experimental units for the two phases: survival, number of N1 offspring, total number of offspring, and per capita intrinsic rate of increase (r , day⁻¹). The latter was iterated from the Euler-Lotka equation:

$$1 = \sum_{x=0}^n e^{-rx} l_x m_x ,$$

where x stands for age class (d), l_x is the probability of surviving to age x , and m_x represents age-specific fecundity.

FA analysis was comprised of three stages: a) sample isolation; b) sample extraction; c) FA separation and quantification. After isolating individuals (neonates or adult females) in clean medium (see above), samples were concentrated in VWR glass microfibers filters (1.2 μm pores) and frozen at -80°C in eppendorf microtubes. For each experimental treatment, 3 replicates (consisting of pooled individuals from two glass beakers) were sampled, each containing 200 neonates or 68 adult females (see Experimental design).

The extraction of total lipids of cladocerans and methylation to fatty acid methyl esters (FAMES) was achieved by a modified one step derivatisation method after Gonçalves et al. (2012). The fatty acid methylnonadecanoate C19:0 was added as an internal standard for later quantification (Fluka 74208). Samples were then centrifuged in a Thermo Scientific Heraeus Megafuge 16 R stored and frozen in new vials.

Samples were subjected to gas chromatography (GC) for separation and quantification of FAMES. This was performed in a Capillary GC (Varian CP-3800) coupled with a flame ionization detector (FID), in a split injection system with a biodiesel for FAME column (30 m \times 0.32 mm \times 0.25 μ m). The column temperature was set at 120°C and then programmed to increase up to 250 °C at a ratio of 4°C/min. The detector and injector were set at 250°C. The carrier gas was helium at a flow rate of 2 mL/min.

Statistical analysis

Fecundity data and the rate of increase (r) were analyzed with a two-way ANOVA, using generation (= phase) and S-metolachlor concentration as factors. A significant interaction between both factors means that the potential effect of the herbicide differs between generations; therefore, in this case, the effect of S-metolachlor concentration was also analyzed for each generation separately. To do so, we used a one-way ANOVA – followed by a Dunnett test – to discriminate significant differences relatively to the control.

GC profiles were converted to proportional relative abundances of FA, and analyzed with principal component analysis (PCA), using a correlation matrix. This ordination technique allows reducing a complex multivariate matrix to a few dimensions, without assuming an underlying data structure (ter Braak, 1995). Ultimately, PCA reduces the FA profiles to interpretable bidimensional plots that explained the highest proportion of variation in the data (following ter Braak, 1995). Three-way analyses of variance (ANOVA) were then performed on the PCA sample scores to assess significant differences among generation (F_0 vs. F_1 or phase 1 vs. phase 2), developmental stage or age (adult females vs. offspring), and S-metolachlor concentration, as well as their interactions. This provided an assessment of the sources of variation for the overall FA profile, including the effect of S-metolachlor on the FA profiles of *D. longispina*. Similar approaches have been described in the literature for other physiological data matrices (e.g. Loureiro *et al.* 2013; Correia *et al.* in press). In order to explore potential differences in terms of specific FA, individual three-way ANOVAs (generation \times age \times concentration) were employed, using the proportional relative abundance of the selected FAs.

All analyses were conducted with the software Minitab (v16) and the significance level used was 0.05.

Results

The overall mortality of the assay was very low (< 10%). Consistent differences were found among generations (= experimental phases), with generation F₀ displaying a higher performance in terms of fecundity and rate of increase (Fig. 2). On the contrary, no significant differences were found for total fecundity or rate of increase between concentrations on both phases (Fig. 2). However, a significant interaction between generation and concentration was found in the fecundity of the first clutch. Indeed, there was a significant decrease of the number of neonates per female in the highest concentration of the assay (7.50 mg/L S-metolachlor) for phase 1 (F₀ generation), whereas no effects of S-metolachlor were observed in F₁ generation (Fig. 2).

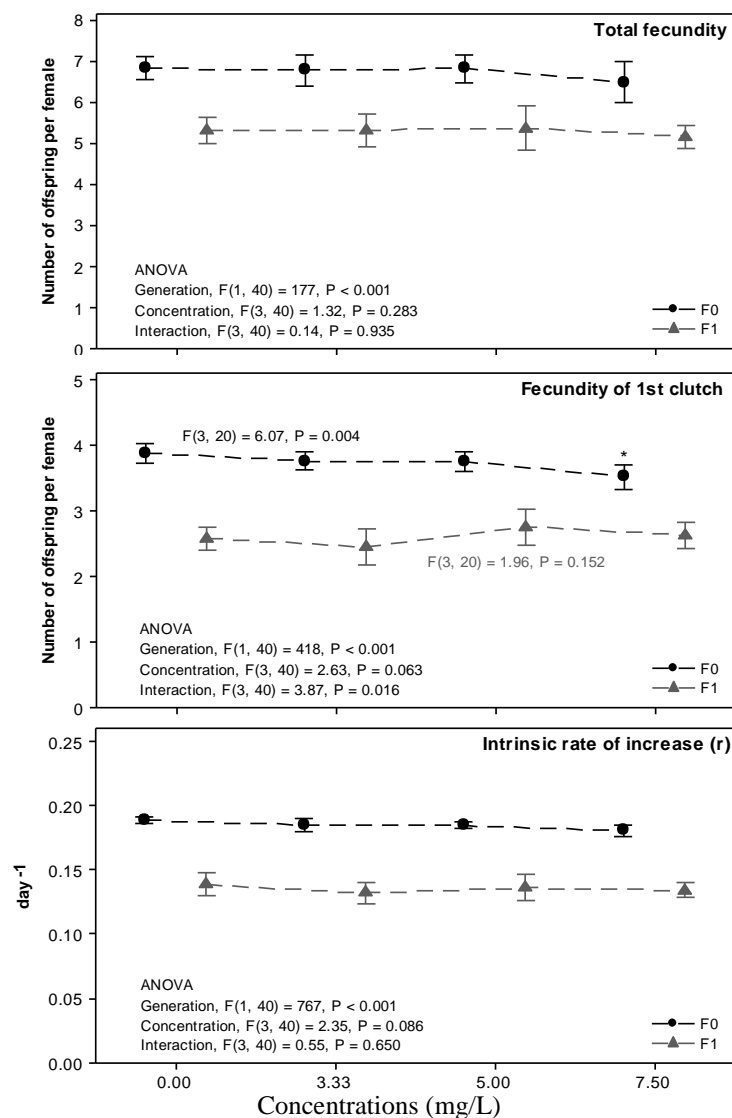


Fig. 2- Effects of the active ingredient S-metolachlor on reproductive and populational parameters of *D. longispina* (total fecundity, fecundity at 1st clutch and intrinsic rate of increase (r)) in two distinct experimental phases (see Fig. 1). Black circles represent data from S-metolachlor-exposed animals (see concentrations in x axis, in mg/L) – phase 1 or F₀ generation – and their offspring –

phase 2 or F₁ generation (grey triangles). In each case, the mean and respective 95% confidence intervals are presented, as well as associated significance (ANOVA results and significant differences from the control, depicted with *).

The abundance (in %) of fatty acids extracted from the sample is referred in table 2. In general, the percentage of FA was higher in offsprings and mothers from F0 than from F1, mainly at the lower concentrations, being stronger on SFA. It was also observed higher percentage of FA with longer carbon chain and double bonds (e.g. MUFA, PUFA and HUFA) than FA with shorter carbon chain (e.g. SFA with shorter carbon chain). The total percentage of MUFA was higher in F1 than in F0, mainly at lower concentrations. No significant differences were observed at the other classes of FA among phases (F0 and F1).

PCA revealed some differences among samples, as seen by the data scatter in Fig. 3. However, these differences were inconsistent among experimental treatments (Fig. 4); indeed, three-way ANOVAs revealed that no significant differences were found in PCA scores across generations, organism age, or S-metolachlor concentration (Table 3).

Table 2-Fatty acid abundance mean values expressed in % for each S-metolachlor concentration (in mg/L), age (O stand for offspring and M stand for the mothers) and generation F0 (light gray) and F1 (dark gray).

Phase		Phase 1 (with toxicant- F0)								Phase 2 (without toxicant-F1)							
Concentration (in mg/L)		CTL		3.33		5.00		7.50		CTL		3.33		5.00		7.50	
Age		O	M	O	M	O	M	O	M	O	M	O	M	O	M	O	M
SFA	C6:0	0	0	11.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0.1	0	0	0	0
	C8:0	0	0.0	3.1	0	0	1.1	0	0	0	0.3	0	0.1	1.2	0	0	0
	C10:0	0	0.0	0.5	0.3	0	0.7	0	0	0	0.1	0	0.1	0	0	0.3	0.07
	C12:0	1.7	0.0	0.5	0.2	0	0.2	0.03	0	0.02	0.2	0.6	0.1	0.1	0	0.1	1.1
	C13:0	0	0.0	0.05	0.1	0.1	0.1	0.06	0	0	0.2	0.4	0.1	0.1	0	0.2	0.1
	C14:0	2.6	0.0	2.9	0.1	0	0.02	0	0	0.07	0.3	0.2	0.1	0.1	0.02	0.3	0.1
	C15:0	0	0.1	0.2	0.1	0	0	0	0	0.03	0.2	0.2	0.1	0.1	0.13	0.2	0.4
	C16:0	0.1	2.4	7.2	0	0	0.02	3	0.2	1.5	13.4	11.8	2.7	17	0.03	6.2	0.4
	C17:0	2	0.5	0.9	0.6	0.2	0.1	0.4	0.1	0.1	0.3	1.1	2.2	0.4	0.08	0.5	0.6
	C18:0	1.5	3.1	2.1	6	0.7	1.5	0.3	2.5	0.8	3.3	2.4	0.4	0.4	0.3	1.8	0.6
	C20:0	2.2	9.8	2.8	22.4	11.1	15.3	9.4	23.4	12.9	4.7	2.4	6.3	8.9	15.9	3.1	11.5
	C21:0	0.8	14.0	0.4	0.8	1	1.9	0.8	4.8	1	1.4	2.5	0.4	5.4	1	2.5	2.6
	C22:0	0.7	1.5	1.3	0.3	0.5	1.1	0.4	0.5	0.7	0.2	0.4	1	3.9	0.3	0.3	1.2
	C23:0	1.7	2.2	2.8	2.8	0.8	0.5	3	0.6	2.2	0.6	2.8	4.2	0.4	1.4	1.2	1.9

MUFA	C24:0	2.6	0.7	3.1	0.3	0.3	1.6	0.9	1.6	0.2	2.2	2.9	2.3	1.3	3.5	10.6	1.8
	Total % of SFA	15.9	34.2	39.65	34	14.7	24.14	18.29	33.7	19.52	27.4	27.7	20.2	39.3	22.66	27.3	22.37
	C14:1	0	0.3	0.5	0.2	0.03	0.02	0.2	0	0.04	0.8	0.9	0.003	0.1	0.01	0.4	0.1
	C15:1w5(cis10)	0	0.1	0.1	0.2	0.1	0	0.08	0.06	0	0.1	0	0.05	0.1	0.02	0.04	0.3
	C16:1 (cis-9)	2.5	0.5	1.1	0.8	1.6	0.2	0.4	0.04	0.2	2	1.4	0.1	0.6	0.1	0.9	0.5
	C17:1w7(cis10)	3.1	0.3	1.1	0.7	0.1	1.6	0.5	0.9	0.5	1.4	0.2	0.9	0.6	0.2	0.2	1.1
	C18:1n9t	0.4	0.8	0.9	0.1	1.4	1.6	1.1	0.9	1.3	2.2	1.3	5.4	0.7	0.7	0.8	1.4
	C20:1n9(cis11)	0.5	4.0	0.1	2.9	7.2	17.6	6.4	12.4	17	6.1	13.6	8.7	8.6	17.7	3.3	12.6
	C22:1n9	5.3	0.5	1.1	1.1	0.2	1	1.5	0.2	0.2	1.3	0.9	0.6	1.1	0.3	0.7	0.9
	C24:1n9	7.3	4.4	7.8	3.4	1.7	0.6	2.4	1.2	1	6.2	15.3	1.5	1.4	3.4	2.4	2.9
	Total % MUFA	19.1	11.0	12.7	9.4	12.3	22.6	12.6	15.7	20.2	20.1	33.6	17.3	13.2	22.4	8.7	19.8
PUFA	C18:2n6c	0.1	1.8	3.9	0.1	0.6	3.7	0	1.7	0.3	1.3	0.5	3	0.9	1.4	0.02	1.6
	C18:2n6t	0	0.7	1.4	0.1	0.2	0.6	0.3	0.7	0.7	2.9	1.1	0	0	18.4	0	3.9
	C18:3n6	29.3	8.3	18.9	28.5	20.4	0.4	10.9	0.1	21	19.3	0	12.9	25.1	0.6	34.8	0.04
	C18:3n3	17.4	16.8	20.8	19.1	26.1	7.2	32.9	19.2	12	17.5	18.8	28.9	4.4	11.8	11.8	40.2
	C20:2w6	2.8	2.9	0.9	1.9	5.7	14	5.9	8.1	14.1	2.9	3.6	6.3	4.5	8.3	8	5.3
	C20:3n6	0.3	3.6	6.5	4.7	9.1	11.5	4	7.2	3.5	1.3	1.4	1.6	3.1	11	2.4	2
	C20:3n3	8.2	4.5	0.1	1	3	5.6	7.4	6.7	3.9	2.7	6.4	2.5	2.8	0.6	2.2	2.2

HUFA	Total% PUFA	58.1	38.6	52.5	55.4	65.1	43.0	61.4	43.7	55.5	47.9	31.8	55.2	40.8	52.1	59.2	55.2
	C20:4n6	0.7	4.9	0.1	0.4	3.7	4.2	3.1	1.8	2.4	3.4	3.4	4.6	2.3	1	2.2	0.5
	C20:5(EPA)	1	2.1	1.8	0.7	3.4	4	2.8	3.7	2.1	0.8	1.6	1	5.2	0.7	2.1	1.5
	C22:6(DHA)	5.3	6.1	11	0.7	0.8	2.1	1.8	1.3	0	0.6	2	2.3	0.5	1.2	0.9	1
	Total % HUFA	7	13.1	12.9	1.8	7.9	10.3	7.7	6.8	4.5	4.8	7	7.9	8	2.9	5.2	3
	Total %	100.1	96.9	117.75	100.6	100.0	100.1	99.97	99.9	99.8	100.2	100.1	100.6	101.3	100.09	100.5	100.4
	n	25	33	34	31	27	31	28	26	28	33	29	33	31	29	31	32

Table 3- Summary of three-way ANOVA on the fatty acid profiles (principal components 1 and 2 – PC1 and PC2), showing the degrees of freedom (d.f.), variance (MS), *F* test and corresponding *P* value.

Data	Source of variation	Fatty acids scores for PC1				Fatty acids scores for PC2			
		d.f.	MS	<i>F</i>	<i>P</i>	d.f.	MS	<i>F</i>	<i>P</i>
Analysis of the FA profiles	Concentration	3	10.4	0.79	0.179	3	3.45	0.79	0.512
	Generation	1	0.150	0.62	0.875	1	2.72	0.62	0.438
	Age	1	6.71	0.05	0.298	1	0.24	0.05	0.817
	Concentration × Generation	3	6.85	0.14	0.346	3	0.61	0.14	0.936
	Concentration × Age	3	3.86	0.17	0.592	3	0.728	0.17	0.919
	Generation × Age	1	5.55	1.26	0.433	1	5.55	1.26	0.270
	Concentration × generation × Age	3	2.48	0.56	0.339	3	2.48	0.56	0.643
	Residual	29	5.967			29	4.397		

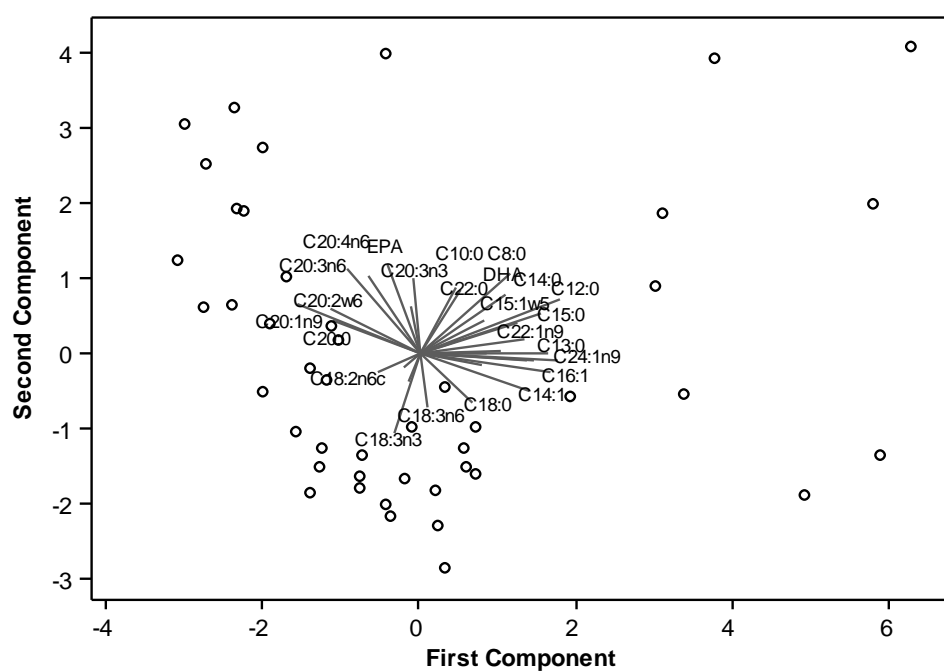


Fig. 3 – PCA biplot of fatty acid profile of *D. longispina* illustrating their variation. Open circles depict samples (= experimental units) and arrows represent fatty acids.

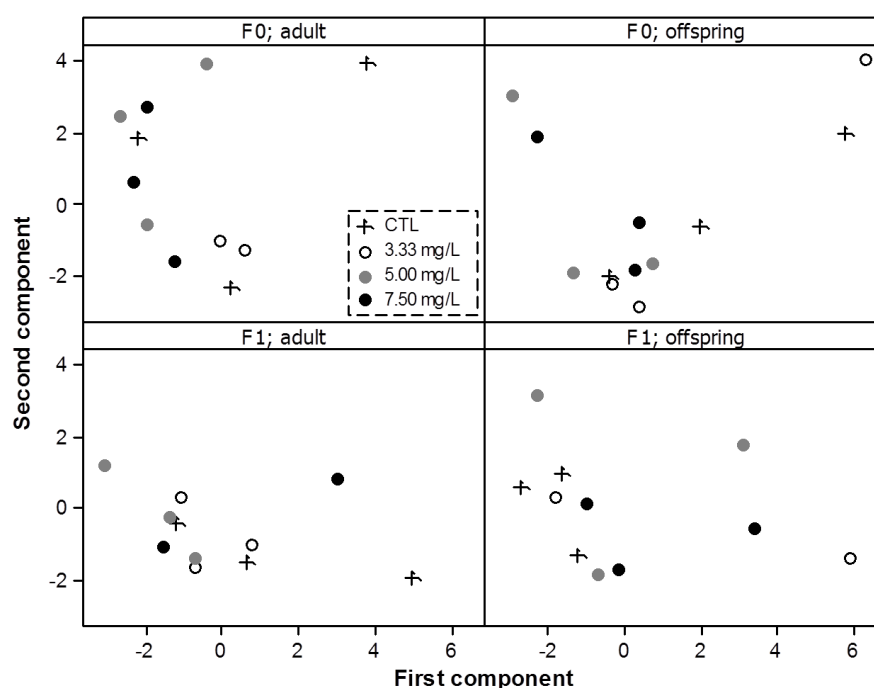


Fig. 4- PCA biplot of fatty acid profile of *D. longispina* illustrating their variation according to S-metolachlor concentrations (see legend), developmental stage (or age) of organisms (adult vs. offspring), and experimental phase or generation (phase 1 = F_0 generation; phase 2 = F_1 generation).

Three-way ANOVAs applied to essential fatty acids data (EPA and DHA) also showed inconclusive results about the effects of S-metolachlor in this specific group of FA (Table 4). Thus, we did not find any evidence that S-metolachlor could cause changes in the FA profile of *D. longispina*, nor that it could induce multigenerational effects, contrary to the alterations observed in the fecundity at the first clutch (found in the highest concentration).

Table 4- Summary of three-way ANOVA on fatty acids (EPA and DHA), showing the degrees of freedom (d.f.), variance (MS), *F* test and corresponding *P* value.

Data	Source of variation	Fatty acids scores for EPA				Fatty acids scores for DHA			
		d.f.	MS	<i>F</i>	<i>P</i>	d.f.	MS	<i>F</i>	<i>P</i>
Analysis of EPA and DHA profiles	Concentration	3	0.00109	1.49	0.238	3	0.00145	0.71	0.556
	Generation	1	0.000200	0.28	0.604	1	0.00517	2.51	0.124
	Age	1	0.000416	0.57	0.455	1	0.000028	0.01	0.908
	Concentration × Generation	3	0.000146	0.20	0.895	3	0.00203	0.98	0.414
	Concentration × Age	3	0.000255	0.35	0.789	3	0.000881	0.43	0.734
	Generation × Age	1	0.00136	1.87	0.182	1	0.000377	0.18	0.672
	Concentration × Generation × Age	3	0.000269	0.37	0.775	3	0.000753	0.37	0.778
	Residual	29	0.00073			29	0.002058		

Discussion

The populational results of phase 1 (F_0) showed a less toxic scenario than expected, taking into account the EC values obtained in the 21 d reproduction test. However, while reproduction tests were conducted in ten individualized replicate experimental units (with only one individual per 50 mL glass beaker, in this experiment larger beakers were used (400 mL) and organisms were exposed within a simulated population (40 individuals per beaker). A putative populational effect could be expected; several authors prefer assessing the effects of pesticides in mesocosm simulations, as they provide a more realistic assessment of noxious effects (e.g. Wendt-Rasch *et al.* 2003). Alternatively, our results could be due to a better performance of the batch of daphnids used in this experiment in comparison to those used in the chronic test. Unfortunately, this can sometimes happen as a consequence of food quality fluctuations. Repetition of the experiments may clarify this.

Despite this fact, there was a significant decrease in the fecundity at the first clutch in the highest concentration, thus confirming the toxicity of S-metolachlor. There was also an underperformance in the F_1 (phase 2) generation; this could be explained by phenomena of

overpopulation in the glass beakers (Carvalho & Hughes 2006). Because of the large number of animals necessary for FA analysis, we had to stock the beakers with a large number of mothers (in this case, 40 individuals for each 400 mL glass beaker). The effect elicited by S-metolachlor was not perceptible in phase 2 of the experiment, i.e. there were no reproductive or populational effects of S-metolachlor in the subsequent generation. Several studies provide data about substances (mainly endocrine substances) with multi-generational effects (Brennan *et al.* 2006; Clubbs and Brooks 2007; Dietrich *et al.* 2010; Marteinson *et al.* 2010). Brennan *et al.* (2006) showed that diethylstilbestrol and 4-nonylphenol (estrogens) can lead to multi-generational effects, such as lower number of offspring per clutch and altered moulting in posterior generations. The fact that the active ingredient tested does not promote multi-generational effects is important from an ecological perspective, because it is indicative of full recovery of the cladoceran populations in the absence of the toxicant.

Although FA profiles of *D. longispina* were not altered by S-metolachlor, the percentage of FA was higher in organisms (neonates and mothers) exposed to S-metolachlor (F0) than those not exposed to the toxicant (F1). S-metolachlor is a chloroacetamide used as pre-emergent herbicide that acts by inhibiting the biosynthesis of several molecules (most noticeable, proteins and lipids). Since cladocerans do not synthesize their own FA and uptake them from food (algae), it is therefore unlikely that S-metolachlor could directly alter their FA profiles. Nonetheless, it could affect FA profiles through indirect ways (e.g. triglycerides) (Rico-Martínez *et al.* 2012). For example, some FA are bioconverted by daphnids and other consumers (Dalsgaard *et al.* 2003).

Conclusion

The present study reveals important data about the toxic effects of S-metolachlor and its commercial formulations. It is important to notice that this herbicide is widely used in corn crops (among others) in Portugal and other EU countries. Its application in agroecosystems with neighboring aquatic systems may represent a hazard for indigenous freshwater invertebrate species (such as *D. longispina*). According to Cerejeira *et al.* (2003), the amount of metolachlor found in Portuguese surface waters is very low (0.056 mg/L). Therefore, the concentrations used in our study could correspond to a catastrophic contamination event. However, the values reported by Cerejeira *et al.* (2003) surpassed the European threshold (0.0001 mg/L) for chloroacetamides in drinking water (Peña *et al.* 2013).

This study also provides data about the effect of S-metolachlor on the FA profiles and their importance as ecophysiological indicators. Molecular biomarkers can provide ecophysiological data about metabolic changes, before the occurrence of populational effects. Several protein (Rocha and Souza 2011; Badiou-Bénéteau *et al.* 2012), lipid (Lerch *et al.* 2011; Orhan *et al.* 2013), and fatty acids (Perrat *et al.* 2013) biomarkers have been used to assess the effects of xenobiotics on metabolic pathways. When combined with other ecophysiological indicators, such molecular biomarkers could provide a better insight on the effects of xenobiotics in non-target organisms.

References

- Antunes, S.C.; Castro, B.B.; Gonçalves, F.; (2003) Chronic responses of different clones of *Daphnia longispina* to different food-levels. Acta Oecologica 823: S325-S332
- Arts, M.T.; Brett, M.T.; Kainz, M.J.; (2009) Lipids in Aquatic Ecosystems. Springer, New York.: 377
- Ateşşahin, A.; Karahan, I.; Türk, G.; Gür, S.; Yilmaz, S.; Çeribasi, A.O.; (2006) Protective role of lycopene on cisplatin-induced changes in sperm characteristics, testicular damage and oxidative stress in rats. Reproductive Toxicology 21(1): 42-47
- Badiou- Bénétiau, A.; Carvalho, S.M.; Brunet, J.L.; Carvalho, G.A.; Buleté, A.; Giroud, B.; Belzunces L.P.; (2012) Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honeybee *Apis mellifera*: Application to the systemic insecticide thiamethoxam. Ecotoxicology and Environmental Safety 82: 22–31
- Bell, M.V.; Henderson, R.J.; Sargent, J.R.; (1986) The role of polyunsaturated fatty acids in fish. Comparative Biochemistry and Physiology 83B:711-719.
- Benatti, P.; Peluso, G.; Nicolai, R.; Calvani M.; (2004) Polyunsaturated Fatty Acids: Biochemical, Nutritional and Epigenetics Properties. Journal of the American College of Nutrition 23: 281-302.
- Brennan, S.J.; Brougham, C.A.; Roche, J.J.; Forgaty, A.M.; (2006) Multi-generational effects of four selected environmental oestrogens on *Daphnia magna*. *Chemosphere* 64: 49-55
- Brett, M.T.; Müller-Navarra, D.C.; (1997) The role of highly unsaturated fatty acids in aquatic foodweb processes. Freshwater Biology 38: 483-499
- Brett, M.T.; Müller-Navarra, D.C.; Ballantyne, A.P.; Ravet, J.L.; Goldman, C.R.; (2006) *Daphnia* fatty acid composition reflects that of their diet. Limnology and Oceanography 51(5): 2428-2437
- Caramujo M.J.; & Boavida M.J.; (2000). The crustacean communities of river Tagus reservoirs: zooplankton structure as reservoir trophic state indicator. Limnetica 18:37-56.
- Carvalho, G.R.; Hughes, R.N.; (2006) The effect of food availability, female culture-density and photoperiod on ephippia production in *Daphnia magna* Straus (Crustacea: Cladocera). Freshwater Biology 13(1): 37–46
- Cerejeira, M.J.; Viana, P.; Batista, S.; Pereira, T.; Silva, E.; Valério, M.J.; Silva, A.; Ferreira, M.; Silva-Fernandes, A.M.; (2003) Pesticides in Portuguese surface and ground waters. Water Research 37: 1055–1063
- Clubbs, R.L.; Brooks, B.W.; (2007) *Daphnia magna* responses to a vertebrate estrogen receptor agonist and an antagonist: A multigenerational study. Ecotoxicology and Environmental Safety 67(3): 385–398

- Correia, B.; Pintó-Marijuan, M.; Neves, L.; Brossa R.; Dias M.C.; Costa A.; Castro B.B.; Araújo C., Santos C., Chaves M.M., Pinto G. (in press) Water stress and recovery in the performance of two *Eucalyptus globulus* clones: physiological and biochemical profiles. Physiologia Plantarum
- Craig, A.; Sidaway, J.; Holmes, E.; Orton, T.; Jackson, D.; Rowlinson, R.; Nickson, J.; Wilson, I.; Nicholson, J.; (2006) Systems Toxicology: Integrated Genomic, Proteomic and Metabonomic Analysis of Methapyrilene Induced Hepatotoxicity in the Rat. Journal of Proteome Research 5(7): 1586-1601
- Cunningham Jr., F.X.; Pogson, B.; Sun, Z.; McDonald, K.A.; DellaPenna, D.; Gantt, E.; (1996) Functional Analysis of the B and E Lycopene Cyclase Enzymes of *Arabidopsis* Reveals a Mechanism for Control of Cyclic Carotenoid Formation. The Plant Cell 8: 1613-1626
- Dalsgaard, J.; St. John, M.; Kattner, G.; Müller-Navarra, D.; Hagen, W.; (2003) Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment. Advances in Marine Biology 46: 225-340
- Davidson, L. A.; Wang, N.; Shah, M. S.; Lupton, J. R.; Ivanov, I.; Chapkin, R. S.; (2009) n-3 Polyunsaturated fatty acids modulate carcinogen-directed non-coding microRNA signatures in rat colon. Carcinogenesis 12 (30): 2077-2084
- Demott, W.R.; Müller-Navarra, D.C.; (1997) The importance of highly unsaturated fatty acids in zooplankton nutrition: evidence from experiments with *Daphnia*, a cyanobacterium and lipid emulsions. Freshwater Biology 38: 649-664
- Desvillettes, C.; Bourdier, G.; Amblard, C.; Barth, B.; (1997) Use of fatty acids for the assessment of zooplankton grazing on bacteria, protozoans and microalgae. Freshwater Biology 38: 629-637
- Dietrich, S.; Ploessl, F.; Bracher, F.; Laforsh, C.; (2010) Single and combined toxicity of pharmaceuticals at environmentally relevant concentrations in *Daphnia magna* – A multigenerational study. Chemosphere 79(1): 60–66
- Forró, L.; Korovchinsky, N.M.; Kotov, A.A.; Petrusek, A.; (2008) Global diversity of Cladocerans (Cladocera; Crustacea) in freshwater. Developments In Hydrobiology 198: 177-184
- Gonçalves, A.M.M.; Azeiteiro, U.M.; Pardal, M.A.; De Troch, M.; (2012) Fatty acid profiling reveals seasonal and spatial shifts in zooplankton diet in a temperate estuary. Estuarine, Coastal and Shelf Science 109:70–80
- He, H.; Chen, G.; Yu, J.; He, J.; Huang, X.; Li, S.; Guo, Q.; Yu, T.; Li, H.; (2013) Individual and Joint Toxicity of Three Chloroacetanilide Herbicides to Freshwater Cladoceran *Daphnia carinata*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 90: 344-350
- Kegley, S.E., Hill, B.R., Orme S., Choi A.H., (2011) PAN - Pesticide Database, Pesticide Action Network, North America (San Francisco, CA.), <http://www.pesticideinfo.org>.
- Laura, D.; De Socio, G.; Frassanito, R.; Rotilio, D.; (1996) Effects of atrazine on *Ochrobactrum anthropi* membrane fatty acids. Applied and Environmental Microbiology 62(7): 2644-2646

- Lerch, T.Z. Dignac, M.F.; Barriuso, E.; Mariotti, A.; (2011) Effect of glucose on *Cupriavidus necator* JMP134 fatty acid composition during 2,4-D degradation: implications for lipid-based SIP methods. Applied and Environmental Microbiology 77(20): 1-39
- Loureiro, C.; Castro, B.B.; Cuco, A.P.; Pedrosa, M.A.; Gonçalves, F.; (2013) Life-history responses of salinity-tolerant and salinity-sensitive lineages of a stenohaline cladoceran do not confirm clonal differentiation. Hydrobiologia 702:73-82
- Martinson, S.C.; Bird, D.M.; Laird Schutt, J.; Letcher, R.L.; Ritchie, I.J.; Fernie, K.J.; (2010) Multi-generational effects of polybrominated diphenylethers exposure: Embryonic exposure of male American kestrels (*Falco sparverius*) to DE-71 alters reproductive success and behaviors. Environmental Toxicology and Chemistry 29(8): 1740–1747
- Mourente, G.; Odriozola, J.M.; (1990) Effect of broodstock diets on lipid classes and their fatty acid composition in eggs of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). Fish Physiology and Biochemistry 8(2): 93-101
- Ohran, H.; Sahin, A.; Sahin, G.; Aypar, U.; Vermeulen, N.P.E.; (2013) Urinary lipid and protein oxidation products upon halothane, isoflurane, or sevoflurane anesthesia in humans: potential biomarkers for a subclinical nephrotoxicity. Biomarkers 18(1): 73–81
- Pasquaud, S.; Lobry, J.; Elie, P.; (2007) Facing the necessity of describing estuarine ecosystems: a review of foodweb ecology study techniques. Hydrobiologia 588: 159-172
- Peña, D.; Albarrán, Á.; López-Piñeiro, A.; Rato-Nunes, J.M.; Sánchez-Llerena, J.; Becerra, D.; (2013) Impact of oiled and de-oiled olive mill waste amendments on the sorption, leaching, and persistence of S-metolachlor in a calcareous clay soil. Journal of Environmental Science and Health 48 (B): 767–775
- Perhar, G.; Arhonditsis, G.B.; (2012) Examination of the role of detritus food quality, phytoplankton intracellular storage capacity, and zooplankton stoichiometry on planktonic dynamics. Ecological Informatics 11: 76–89
- Perrat, E.; Couzinet- Mossion, A.; Tankoua, O.F.; Amiard triquer, C.; Wielgosz-Collin, G.; (2013) Variation of content of lipid classes, sterols and fatty acids in gonads and digestive glands of *Scrobicularia plana* in relation to environment pollution levels. Ecotoxicology and Environmental Safety 90: 112–120
- Rico-Martínez, R.; Arias-Almeida, J.C.; Pérez-Legaspi, I.A.; Alvarado-Flores, J.; Retes-Prunedá, J.L.; “Adverse Effects of Herbicides on Freshwater Zooplankton” in Hasaneen, M.N.A (2012) Herbicides - Properties, Synthesis and Control of Weeds:405-434 Available from: <http://www.intechopen.com/books/herbicides-properties-synthesis-and-control-ofweeds/adverse-effects-of-herbicides-on-freshwater-zooplankton>
- Rocha, C.T.; Souza M.M.; (2012) The Influence of Lead on Different Proteins in Gill Cells From the Freshwater Bivalve, *Corbicula fluminea*, From Defenseto Repair Biomarkers. Archive of Environmental ContaminationToxicology 62:56–67

Rosas, S.B.; Secco, M.C.; Ghittoni, N.E.; (1980) Effects of Pesticides on the Fatty Acid and Phospholipid Composition of *Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology 40(2): 231-234

Roudier, F.; Gissot, L.; Beaudoin, F.; Haslam, R.; Michaelson, L.; Marion, Jessica.; Molino, D.; Lima, A.; Bach, L.; Morin, H.; Tellier, F.; Palauqui, J.C.; Bellec, Y.; Renne, C.; Miquel, M.; DaCosta, M.; Vignard J.; Rochat, C.; Markam, J.E.; Moreau, P.; Napier, J.; Faure, J.D.; (2010) Very-Long-Chain Fatty Acids Are Involved in Polar Auxin Transport and Developmental Patterning in *Arabidopsis*. The Plant Cell 22: 364–375

Sharma, Y.; Bashir, S.; Irshad, M.; Gupta, S.D.; Dogra T.D.; (2005) Effects of acute dimethoate administration on antioxidant status of liver and brain of experimental rats. Toxicology 206: 49-57

Stahl, A.; (2004) A current review of fatty acid transport proteins (SLC27) European Journal of Physiology 447: 722-727

ter Braak, C.J.; (1995) Ordination. In Jongman, R.H.; ter Braak, C.J.; van Tongeren, O.F.; (Eds.), Data analysis in community and landscape ecology (Cambridge University Press):. 91–173.

Trenkamp, S.; Martin, W.; Tietjen, K.; (2004) Specific and differential inhibition of very-long-chain fatty acid elongases from *Arabidopsis thaliana* by different herbicides. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America 101(32): 11903–11908

Warner. K.; Frankel, E.N.; (1987) Effects of β -carotene on light stability of soybean oil. Journal of the American Oil Chemists' Society 64(2): 213-218

Watanabe, T.; Arakawa, T.; Kitajima, C.; Fujita, S.; (1984) Effect of nutritional quality of broodstock diet on reproduction of red sea bream. Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries 50:495-501

Wendel, A.; (1987) Measurement of in vivo lipid peroxidation and toxicological significance. Free Radical Biology and Medicine 3(5): 355–358

Wendt-Rasch, L.; Pirzadeh, P.; Woin, P.; (2003). Effects of metsulfuron methyl and cypermethrin exposure on freshwater model ecosystems. Aquatic Toxicology 63: 243-256